



TITLE:

シトクロムb5の役割を中心とした
CMP-N-アセチルノイラミン酸水酸化機構に関する研究(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

竹松, 弘

CITATION:

竹松, 弘. シトクロムb5の役割を中心としたCMP-N-アセチルノイラミン酸水酸化機構に関する研究. 京都大学, 1996, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

1996-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3110514>

RIGHT:

シトクロム b_5 の役割を中心とした CMP-N-
アセチルノイラミン酸水酸化機構に関する研究

1996

竹松 弘

シトクロム b_5 の役割を中心とした CMP-N-
アセチルノイラミン酸水酸化機構に関する研究

1996

竹松 弘

目次

序論	1
略号	3
第1章 CMP-N-アセチルノイラミン酸水酸化反応の制御因子の解析	4
第1節 CMP-N-アセチルノイラミン酸水酸化反応に対する シトクロム b_5 還元因子の解析	4
第2節 シトクロム b_5 と CMP-N-アセチルノイラミン酸水酸化酵素との 親和性と相互作用の解析	8
第3節 実験方法	10
第4節 考察と総括	12
第2章 膜結合型及び可溶型シトクロム b_5 の生成機構の解析	15
第1節 RT-PCR 法を用いた可溶型シトクロム b_5 cDNA の検出	16
第2節 RACE 法を用いた可溶型シトクロム b_5 cDNA の単離	17
第3節 ウサギ肝臓遺伝子ライブラリーからのシトクロム b_5 遺伝子の 単離と解析	19
第4節 実験方法	20
第5節 考察と総括	24
第3章 CMP-N-アセチルノイラミン酸水酸化反応に関与する シトクロム b_5 分子種の同定	26
第1節 RT-PCR 法による二種類のマウスシトクロム b_5 cDNA の単離	26
第2節 マウス肝臓における二種類のシトクロム b_5 の発現調節	28
第3節 再構成 CMP-N-アセチルノイラミン酸水酸化反応に対する 膜結合型シトクロム b_5 、各種リン脂質の影響	29
第4節 実験方法	31
第5節 考察と総括	33
おわりに	35
結論	36
謝辞	37
引用文献	38

序論

シアル酸は複合糖質の非還元末端をしめる酸性の9炭糖であり、*N*-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) を生合成の前駆体とするノイラミン酸誘導体群の総称である⁽¹⁾。このシアル酸は古くより動物細胞の表層に多く存在して、細胞の酸性電荷に寄与することが考えられてきた。しかし、シアル酸自体に機能があり、シアル酸を含む分子の分子間認識を通して生体内で様々なシグナルが伝達されていることが、シアル酸を含む血清糖タンパク質の血流中での肝実質細胞細胞による取り込みからの安定性⁽²⁾、細胞接着等の細胞間シグナル伝達⁽³⁾、リンパ球のホーミング⁽⁴⁾、腫瘍細胞の転移⁽⁵⁾、インフルエンザウイルスの感染⁽⁶⁾等様々な生物学的現象を解析することにより明らかとなってきた。

このシアル酸は自然界には40種類にも及ぶ多様な分子種が知られており、この多様性の代表的な一例としては、シアル酸の5位のアミノ基に注目するとこれがアセチル化しており最も普遍的に存在すると考えられるNeuAcとこのアセチル基がさらに水酸化された*N*-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) に大別でき (Fig. 0-1)、また、そのほかの代表的な修飾としてはシアル酸の水酸基がアセチル基に変換された*O*-アセチル型のシアル酸の存在も明らかにされている⁽⁷⁾。

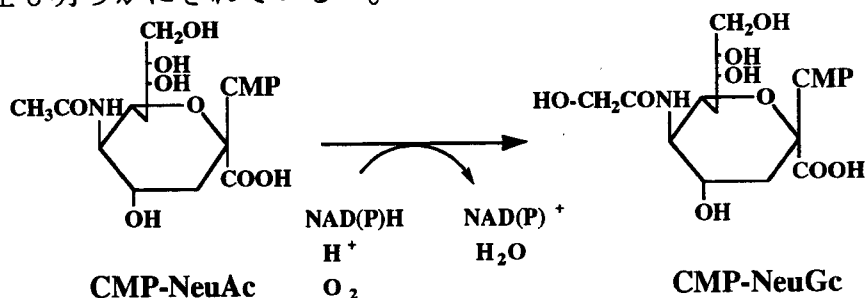


Fig. 0-1. Biosynthesis of *N*-glycolylneuraminic acid. The hydroxylation of NeuAc to NeuGc occurs at the level of sugar nucleotide form in the cytosol.

これらシアル酸の生合成は哺乳動物では*N*-アセチルマンノサミンがリン酸化され*N*-アセチルマンノサミン6リン酸そして*N*-アシルノイラミン酸9リン酸を経てNeuAcが合成され、その後これが多様な修飾を受けることが知られている⁽⁸⁾。しかし、これらの多様性の生理的意義はこれまでほとんど明らかにされていなかった。

著者らはこの多様性の一端を担うシアル酸の代表的な修飾である5位のアセチル基に注目し、糖供与体として存在するCMP-NeuAcを水酸化することによりCMP-NeuGcに変換し、シアル酸に多様性をもたらすCMP-NeuAc水酸化反応について研究を進めてきた。この反応以外にもNeuGcの産生、付加経路の存在は提唱されているものの⁽⁵⁵⁾、

CMP-NeuAc水酸化反応が細胞内のNeuGc産生の最も主要な経路であり、この反応産物であるCMP-NeuGcが各種のシアル酸転移酵素の働きにより複合糖質の糖鎖末端に転移されると考えられている^(9,10)。

このNeuGcを含む複合糖質は古くより動物組織に含まれるH-D抗原として知られており、NeuGcを含む複合糖質はヒトでは癌胎性抗原であることが知られている^(11,12)。シアル酸の最も主要な分子種であるNeuAcに対する修飾がこのような発現調節を受けている事実は非常に興味深い。また、動物組織におけるNeuGcの発現は種、臓器、発生段階などにおいて非常に特異的な調節がされている^(13,14)。この特異的な発現調節を解く鍵として最近新しい知見も得られている。すなわち、マウスの免疫系細胞に発現するシアル酸結合性細胞接着因子であるシアロアドヘジンはNeuAcのみとしか結合できないが、CD22は、NeuAcとともにNeuGcも認識して結合することができ、このようなシアル酸分子種の違いと認識分子の組合わせによりシグナル伝達の調節が行われている可能性が示唆されている⁽¹⁵⁾。

CMP-NeuAc水酸化反応は当教室のこれまでの研究によりNADHよりシトクロム b_5 還元因子、シトクロム b_5 と受け渡された電子が最終的にこの反応の末端酵素であるCMP-NeuAc水酸化酵素に渡されるという以下に示すような電子伝達系を構成する可能性が提唱されている^(16,17)。(Fig. 0-2)

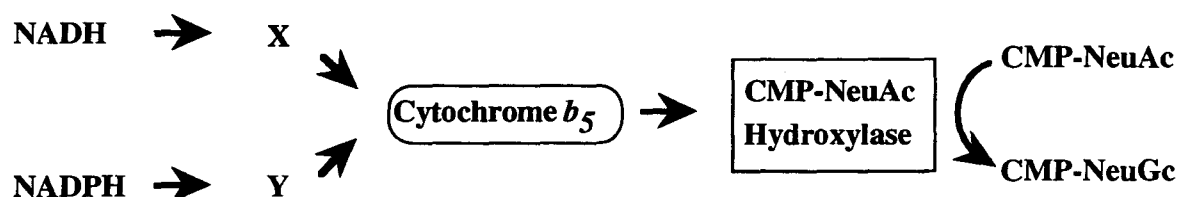


Fig. 0-2 Electron transport system underlying CMP-NeuAc hydroxylation concludes at least three soluble protein components. X and Y are unidentified protein factors which are supposedly involved.

そこで著者は、この電子伝達系の主要な構成因子であるシトクロム b_5 を中心に、第1章ではこのタンパク性因子のうち、 b_5 還元因子⁽¹⁸⁾と b_5 ⁽¹⁹⁾のCMP-NeuAc水酸化反応に対する関与とその反応機構を解析した。第2章では b_5 の生合成機構をcDNA⁽²⁰⁾及びゲノム遺伝子⁽²¹⁾のクローニングをもとに解析した。第3章ではこれらの結果をもとにCMP-NeuAc水酸化反応に関与する b_5 の分子種⁽¹⁹⁾について解析した。以下これらを詳述する。

略号

この論文に使用した略号は以下のものである

AGPC	acid guanidium phenol-chloroform
ATP	adenosine 5'-triphosphate
b_5	cytochrome b_5
bp	base pair
CD	cluster of differnciation
CMP	cytidine 5'-monophosphate
CMP-NeuAc	cytidine 5'-monophosphate- <i>N</i> -acetylneuraminic acid
CMP-NeuGc	cytidine 5'-monophosphate- <i>N</i> -glycolylneuraminic acid
dCTP	deoxy cytidine 5'-triphosphate
DEAE	diethylaminoethyl
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	dithiothreitol
ER	endoplasmic reticulum
FAD	flavin adenosine dinucleotide
H-D	Hanganatziu-Dicher
kb	kilo base pairs
kDa	kilo daltons
Km	Michaelis constant
m- b_5	microsomal form of cytochrome b_5
MMLV	murine molony leukemia virus
NADH	reduced nicotinamide adenosine dinucleotide
NADPH	reduced nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate
NeuAc	<i>N</i> -acetylneuraminic acid
NeuGc	<i>N</i> -glycolylneuraminic acid
PCR	polymerase chain reaction
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RNA	ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription derived polymerase chain reaction
s- b_5	soluble form of cytochrome b_5
TLCK	<i>N</i> -tosyl-L-lysyl chlorometyl ketone
WGA	wheat germ agglutinin

第1章 CMP-N-アセチルノイラミン酸水酸化反応の制御因子の解析

N-グリコリルノイラミン酸 (NeuGc) の発現は、最も普遍的に発現しているシアル酸である N-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) の広汎にわたる発現とは異なり、種、臓器、発生段階など様々な段階で特異的に調節されていることが知られている⁽⁷⁾。この発現調節は主に CMP-NeuAc 水酸化反応により糖供与体である CMP-NeuAc が CMP-NeuGc へと変換されることにより行われていることが明らかにされている^(9,10)。そこで、著者は NeuGc の発現が強いマウス肝臓での CMP-NeuAc 水酸化反応に関わる因子を分画し、ここで得られた画分を利用してシトクロム b_5 還元因子 (b_5 還元因子) とシトクロム b_5 (b_5) の水酸化反応に対する影響及びその反応機構機構を調べた。

第1節 CMP-N-アセチルノイラミン酸水酸化反応に対する シトクロム b_5 還元因子の解析

CMP-NeuAc 水酸化反応は少なくとも3つのタンパク性の因子を介する電子伝達系を構成していると考えられる^(16,17)。すなわち、まず、NADH または NADPH より電子を受け取った b_5 還元因子が b_5 に電子を受け渡す。還元型 b_5 が末端酵素の CMP-NeuAc 水酸化酵素に電子を受け渡す。活性化された酵素が基質である CMP-NeuAc に対して分子上の酸素を利用してモノオキシゲナーゼ反応を行う。また、このマウス肝臓サイトゾール画分全てを酵素源として活性を測定すると、活性が検出され、これにさらに抗 b_5 抗体を加えることにより、この活性は消失することが知られている。

このような CMP-NeuAc 水酸化反応に必要な3つの可溶性の因子を以下の方法で分画した。マウス肝臓サイトゾール画分を DEAE-Sepharose CL-6B カラムにアプライし、これを直線的に NaCl 濃度を上げることにより溶出した。この時タンパクの挙動は 280nm での吸光度で追跡した。その結果、NaCl の濃度が 0.1M 付近で溶出する DE-1 画分と、0.25M 付近で溶出してくる DE-2 画分を得た。これらは単独では CMP-NeuAc を水酸化する活性がみられないが、互いに混合することで活性がみられ、これを指標に分画を行った。DE-1 画分はそれ自体では CMP-NeuAc 水酸化活性を持たないが、これに b_5 を加えることにより CMP-NeuAc から CMP-NeuGc への転換がみられた。これより、DE-2 画分には b_5 が含まれていることが予想された。(Fig. 1-1) しかしこの画分に含まれるシトクロム b_5 は非常に少量であり、以降の実験には大量に調製でき、この活性を補うことのできたウマ赤血球由来の可溶型を利用している。

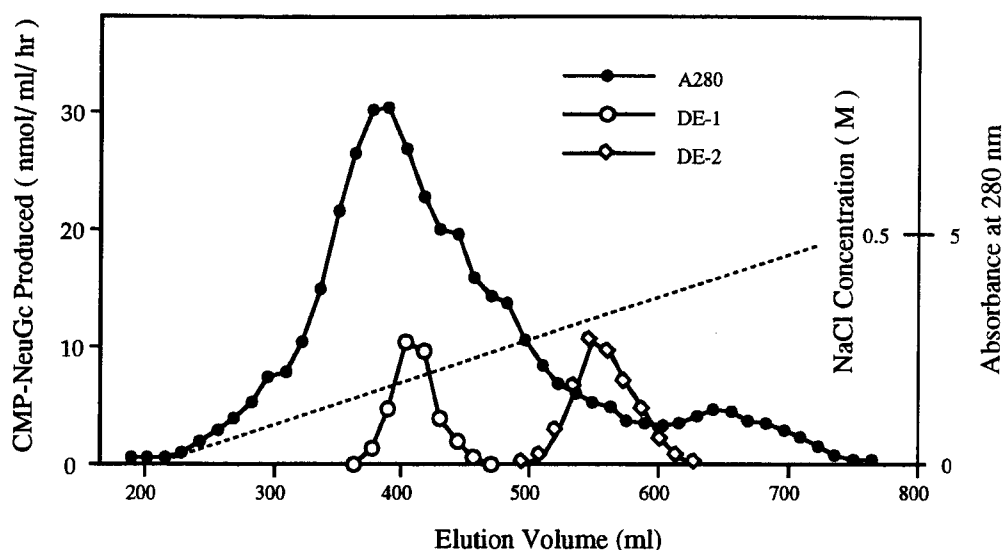


Fig.1-1 DEAE-Sepharose CL-6B chromatography of CMP-NeuAc hydroxylase from mouse liver cytosol. The CMP-NeuAc hydroxylase fraction obtained on ammonium sulfate preparation was chromatographed as described under "EXPERIMENTAL PROCEDURES." filled circle, absorbance at 280nm; open circle, CMP-NeuAc hydroxylase activity in the presence of 20 μ l of the fraction containing the highest DE-2 activity; open box, CMP-NeuAc hydroxylase activity in the presence of 20 μ l of the fraction containing the highest DE-1 activity.

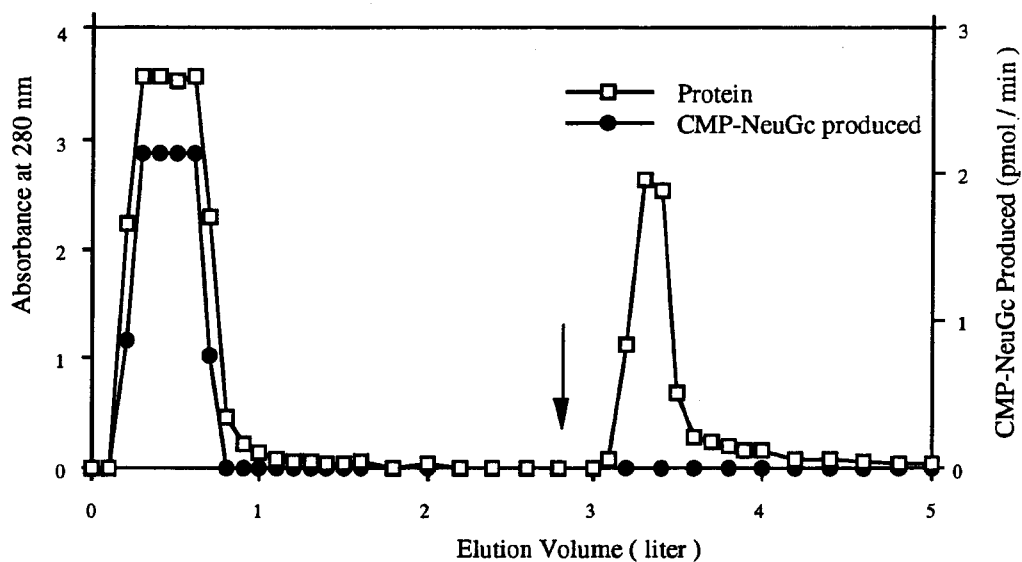


Fig.1-2. Cellulose phosphate P11 column chromatography of the cytosolic proteins of mouse liver: open box, protein (absorbance at 280nm); filled circle, activity of the terminal enzyme, as assayed with abundant of cytochrome b_5 and its reducing factor. The arrow indicates the position where the buffer was changed to that containing 0.5M NaCl.

次に、DE-1画分について、これをリン酸セルロースP11カラムクロマトグラフィーにより、素通り画分と結合画分に分離した。結合画分の溶出には0.5MのNaClを使用し、タンパクの挙動は280nmでの吸光度で追跡した。このP11非結合画分には b_5 とP11結合画分とを加えたアッセイ系でCMP-NeuAc水酸化活性を示した。(Fig. 1-2) 以上3つのどの成分を欠いても再構成系による水酸化活性は検出できなかった。

このP11結合画分と非結合画分をNADHまたはNADPHを電子供与体として b_5 を還元することができるかどうかを424nmの吸光度の上昇を指標として測定した。その結果、 b_5 を還元することのできる画分はP11結合画分で、この画分はNADHの存在下で強く b_5 を還元し、NADPH存在下でも弱いながらも同じ活性がみられた。一方、P11非結合画分にはNADHを高濃度で加えても b_5 の還元はみられなかった。以上のことよりP11結合画分に b_5 還元因子が含まれていることが予想された。(Table 1-1) この因子は一定量の b_5 とP11非結合画分、つまり、CMP-NeuAc水酸化酵素の存在下で再構成系によるCMP-NeuAc水酸化反応に対する濃度依存性を示した。(Fig. 1-3) また、この因子の大まかな分子量を求めるためにマウス肝臓のサイトゾール画分のSuperdex 75によるゲル濾過クロマトグラフィーを行ったが、この溶出物の活性を調べたところ、この b_5 還元因子の分子量は約30kDaであることが明らかとなった。また、CMP-NeuAc水酸化酵素は約58kDaに溶出された。(Fig. 1-4)

Table 1-1. Reduction of cytochrome b_5 with the P11 bound and unbound fractions. ^aThe 50 μ l incubation mixtures contained 2.6 μ g protein of the P11 bound fraction and 2.9 μ g protein of the P11 unbound fraction.

Frction ^a	electron donor	(μ M)	$\Delta A_{424}(\text{min}^{-1})$
P11 bound	NADH	44	0.91
	NADPH	44	0.02
	NADPH	220	0.08
P11 unbound	NADH	220	<0.01
	NADPH	220	<0.01

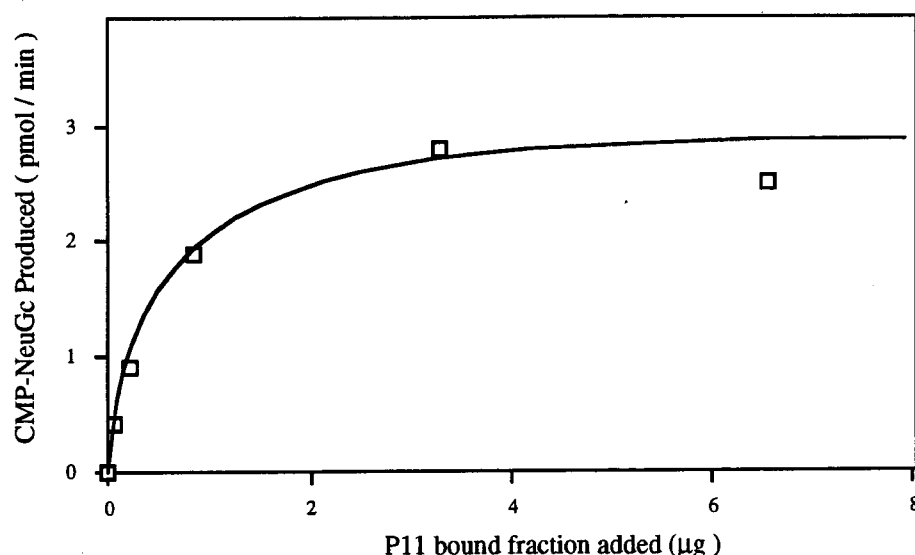


Fig. 1-3. Effect of the P11 bound fraction on the CMP-NeuAc hydroxylation. With the indicated amounts of the P11 bound fraction, the hydroxylation reaction was performed in the presence of 4.8 μg of P11 unbound fraction as an enzyme source, in a total volume of 50 μl. The production rate of CMP-NeuGc is plotted.

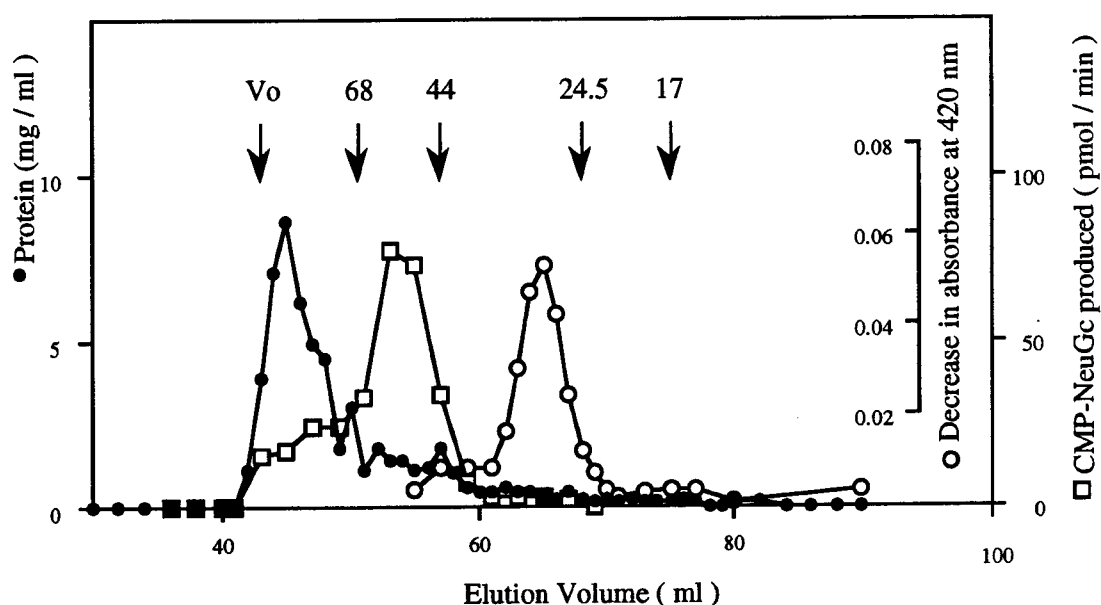


Fig. 1-4. Gel permeation chromatography of the cytosolic proteins of mouse liver on Superdex 75 column: filled circle, protein concentration determined by the BCA method; open box, activity of the terminal enzyme determined with factors needed; open circle, activity of cytochrome b_5 reducing factor determined as the reduction of potassium ferricyanide. Arrows indicate the elution position of molecular mass markers: bovine serum albumin (68kDa), obalbumin (44kDa), alpha-chymotrypsinogen (24.5kDa) and myoglobin (17kDa).

第2節 シトクロム b_5 と CMP-N-アセチルノイラミン酸水酸化酵素 との親和性と相互作用の解析

b_5 は直接末端酵素に電子を受け渡すことが予想されており、したがって、 b_5 と CMP-NeuAc 水酸化酵素は直接相互作用することが考えられる。そこで、まず、この CMP-NeuAc 水酸化反応の重要なステップとしてこれら両者の相互作用を想定し、これについて明らかにするために CMP-NeuAc 水酸化反応に対する b_5 の影響を再構成系の実験を指標として測定した。一定量の b_5 還元因子と CMP-NeuAc 水酸化酵素を含む反応液に段階的に b_5 の濃度を変えて CMP-NeuAc 水酸化活性を測定したところ、この反応は、 b_5 の濃度依存性を示した。これを Lineweaver-Burk プロットしたところ水酸化酵素の b_5 に対する K_m 値は $0.15 \mu\text{M}$ であり、両者には比較的強い親和性があることが明らかになった。(Fig. 1-5)

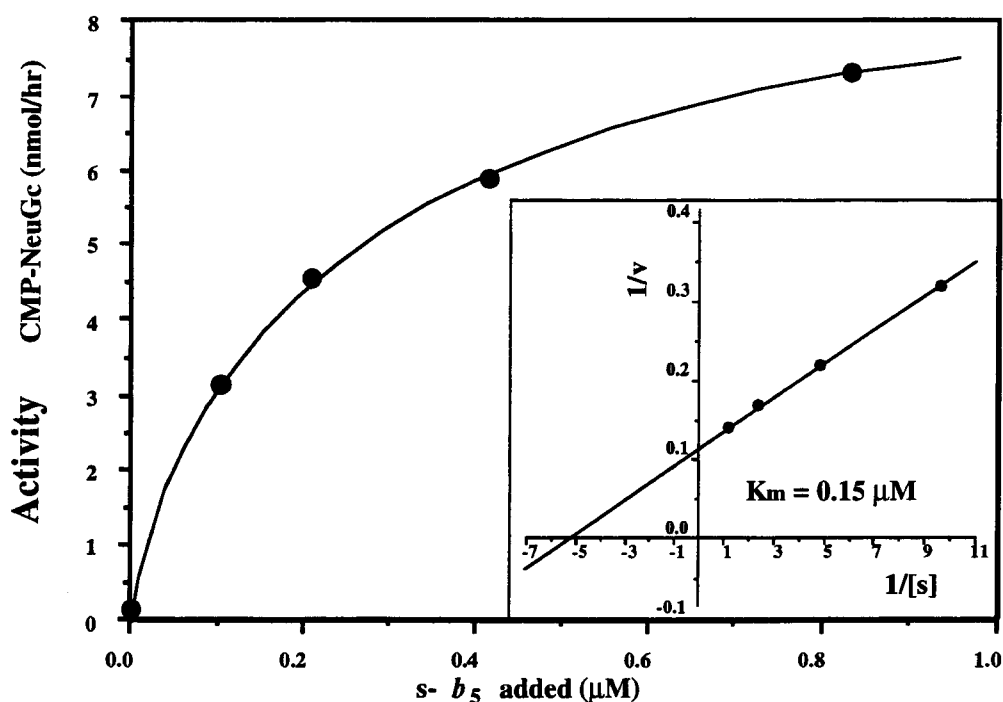


Fig. 1-5. Dependence of the CMP-NeuAc hydroxylase activity on the amount of cytochrome b_5 added. The mouse liver cytosolic fraction ($99.0 \mu\text{g}$), containing the hydroxylase, cytochrome b_5 (b_5) and b_5 reducing factor(s), was incubated with various amounts of the soluble form of b_5 . (inset) Lineweaver-Burk plot of the reaction. The activity increased on the addition of b_5 is plotted.

このことを利用し、水酸化酵素と b_5 の直接の相互作用を検出するために、ウマ赤血球より単離した b_5 を Sepharose-4B に固定し、 b_5 アフィニティーカラムを作製した。クロマトグラフィーを行った。水酸化酵素源としては部分精製したものを利用し、 b_5 アフィニティークロマトグラフィーの溶出画分は CMP-NeuAc 水酸化活性で追った。その結果、CMP-NeuAc 水酸化活性は緩衝液のみではカラムと相互作用はしなかったが、基質である CMP-NeuAc の存在下でカラムから遅れて溶出してきた。また、このカラムとの相互作用は反応産物である CMP-NeuGc の存在下ではみられず、この CMP-NeuAc 水酸化反応の阻害剤である塩の存在下で相互作用が阻害された。さらに、別のこの反応の阻害剤であるアジドを同時に流すとこの相互作用を全く阻害されなかったことより、アジドはこの反応の酵素と b_5 の相互作用とは違うと点で阻害していることが予想された。これらの結果は、CMP-NeuAc 水酸化酵素は、まず、基質である CMP-NeuAc と結合して何らかの高次構造の変化を起こし、はじめて b_5 と結合できることを示している。また、このアフィニティークロマトグラフィーを利用して、共同研究者らにより CMP-NeuAc 水酸化酵素の精製が行われた⁽⁴²⁾。

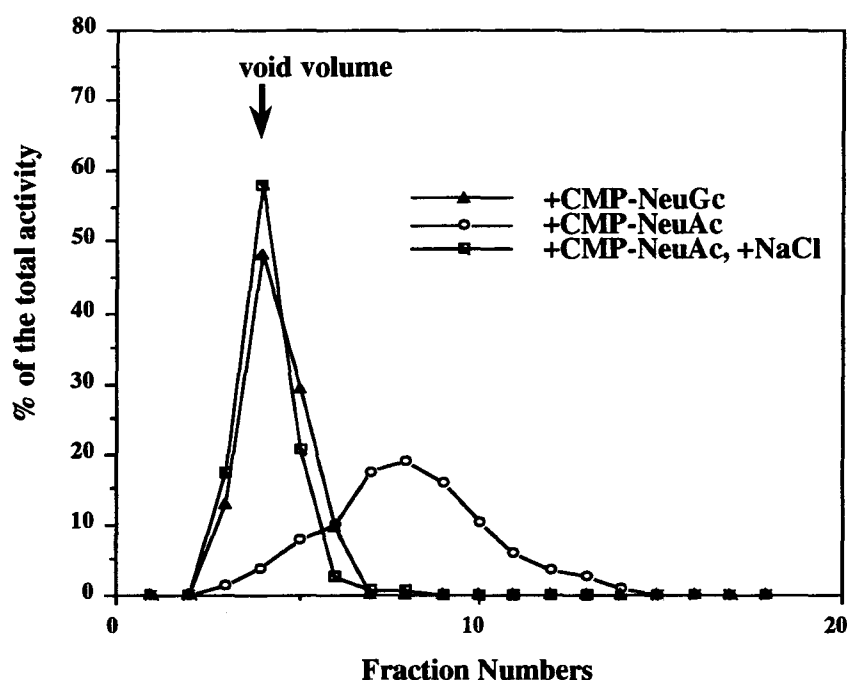


Fig. 1-6. Cytochrome b_5 -Sepharose chromatography of the CMP-NeuAc hydroxylase. The CMP-NeuAc hydroxylase was applied to a cytochrome b_5 -Sepharose column (1 ml) in the presence of 100 μ M CMP-NeuAc (open circle), 100 μ M CMP-NeuGc (filled triangle), and 100 μ M CMP-NeuAc and 100 mM NaCl (Open box filled with dot). Fractions of 0.2 ml were collected and aliquots thereof were used for monitoring the enzyme activity. The arrow indicates the position of the flow-through fraction on elution of the column.

第3節 実験方法

実験材料

CMP-NeuAc、NeuAc および NeuGc は関東化学（東京）より購入した。CMP-NeuGc は MECT（東京）の伊藤博士と富田博士より恵与された。DEAE-Sepharose CL-6B、Sepharose-4B および、Superdex 75 は Pharmacia（Uppsala Sweden）より購入した。TSK-gel ODS-80TM カラム（4.6mm i.d. × 250mm）は東ソーより購入した。その他の試薬は和光純薬（大阪）またはナカライテスク（京都）より購入した。BCA タンパク定量キットは Pierce Chemical より、分子量マーカーとして使用したウシ血清アルブミン、オブアルブミン、 α -キモトリプシンそしてミオグロビンは Sigma（St. Louis, MO, USA）より購入した。また精製されたウマ可溶性シトクロム b_5 は文献 (17) にて精製されたものを使用した。

動物

DBA/2 および ddY マウスは静岡実験動物センター（静岡）より購入した。

マウス肝臓サイトゾール画分の分画

マウスの肝臓を門脈から 0.25M ショ糖、1mM EDTA、 $2 \mu\text{g/ml}$ ペプスタチン A、 $2 \mu\text{g/ml}$ TLCK を含む Tris-HCl pH 7.5 の緩衝液で灌流した。その後、肝臓を単離し、同じ緩衝液中でホモジナイズした。このホモジネートを $10,000 \times g$ で 20 分間遠心した後、さらに 0.5M のショ糖に重層し $140,000 \times g$ で 3 時間超遠心して、サイトゾール画分を得た。このサイトゾール画分を、まず、40% 硫酸アンモニウムで飽和させ、 $12,000 \times g$ で 30 分間遠心した上清をさらに、60% の硫酸アンモニウムで飽和させ、 $12,000 \times g$ で 30 分間遠心し、この沈殿を 0.1mM DTT を含む 10mM Tris-HCl pH 7.5 緩衝液（緩衝液 A）に溶解した。その後、硫酸アンモニウムを除くために同じ緩衝液 A で透析を行い、以下のカラムクロマトグラフィーに用いた。まず、この硫酸アンモニウム 40~60% 画分を緩衝液 A で平衡化した DEAE-Sepharose CL-6B（26mm i.d. × 410mm）カラムにアプライした。この結合画分は緩衝液 A で洗浄した後、直線的に NaCl の濃度を 0M から 0.5M にあげることににより溶出した。このカラムより 0.1M~0.2M の NaCl で溶出された画分を DE-1 画分、0.25~0.3M の NaCl で溶出された画分を DE-2 画分とした。このフラクションは 280nm の吸光度と以下に示す CMP-NeuAc 水酸化活性の測定を行った。

DE-2画分はさらに、12.5% グリセロールと0.1mM DTTを含むリン酸ナトリウム pH 7.0 緩衝液（緩衝液 B）で透析し、その後、緩衝液 B で平衡化したリン酸セルロースカラム P11（50mm i.d. × 130mm）にアプライした。その後、緩衝液を 0.5M NaCl を含む緩衝液 B に変えて結合物の溶出を行った。これらのフラクションは 280nm の吸光度と以下に示す CMP-NeuAc 水酸化活性の測定を行った。

CMP-NeuAc 水酸化活性の測定

CMP-NeuAc 水酸化活性は文献 (16) に準じて行った。マウス肝臓サイトゾール画分を使用する場合には、これをまず 0.15M NaCl と 1mM EDTA と 0.1mM DTT を含む 10mM Tris-HCl pH 7.5 緩衝液で透析し、その後、0.1mM DTT を含む 10mM Tris-HCl pH 7.5 緩衝液もう一度透析し内在性の CMP- シアル酸を除き、酵素源として使用した。酵素反応液には 10mM Tris-HCl 緩衝液に 34n モルの NAD (P) H、2n モルの CMP-NeuAc、1mM DTT と CMP-NeuAc 水酸化酵素源またはシトクロム b_5 源または b_5 還元因子源を適宜含む溶液を最終用量を 50 μ l に調製し、37℃で反応させた。なお、ポジティブコントロールとしてはそれぞれ、CMP-NeuAc 水酸化酵素を 14.5 μ units、可溶性 b_5 を 40p モル、 b_5 還元因子をタンパク 5.5 μ g 使用している。この反応は 0.3ml の氷冷エタノールと混合することで停止させ、15分間氷冷した後に 10,000g で 5分間遠心分離した。移動相を 15mM のリン酸アンモニウム、固定相を TSK-gel ODS-80TM、流速 0.5ml/min の条件でこの上清を逆相 HPLC で分離し、その 271nm での CMP の吸光を指標に定量を行った。この条件で、反応基質の CMP-NeuAc と反応産物の CMP-NeuGc とが分離され定量できる。

シトクロム b_5 還元アッセイ

b_5 に対する還元力を測定するために、反応液は 2.9 μ M の可溶性 b_5 と 44 μ M NAD (P) H または 220 μ M NAD (P) H と P11 カラムの溶出画分を含む Tris-HCl pH 7.5 緩衝液に最終用量 50 μ l に調製し、これを 25℃で反応させ、424nm の吸光度の増加を DU-64 吸光度計（Beckman Ins. Inc. Fullerton, CA, USA）で測定した。

ゲル濾過クロマトグラフィー

先ほど得られた DE-1 画分を緩衝液 A で平衡化した Superdex 75 カラム（16mm i.d. × 600mm）にアプライして分画した。これらのフラクションはそれぞれ BCA タンパク定量キットでのタンパク定量と CMP-NeuAc 水酸化活性の測定及び 420nm での吸光度の減少をみるフェリシアン化カリウムの還元活性の測定を行った。使用した分子量マーカーはそれぞれウシ血清アルブミン（68kDa）、オブアルブミン（44kDa）、 α -キモトリプシン（24.5kDa）そしてミオグロビン（17kDa）である。

シトクロム b_5 アフィニティークロマトグラフィー

b_5 -Sephrose 4B カラムは、精製されたウマ可溶型 b_5 (5.25mg) と 4.4ml の BrCN 活性化 Sepharose 4B を最終用量 12ml 中で一晩 4°C で反応させて得られた。この反応により 90 % 以上の b_5 がカラムに固定された。ここで得られた b_5 -Sephrose 4B の 1ml を、緩衝液 A で平衡化し、部分的に精製された CMP-NeuAc 水酸化酵素 (0.6munit/100 μ l) を流速 0.1ml/分 で流した。このとき、本文のように反応基質など様々な因子を同時に流している。ここで得られたフラクションはそれぞれ CMP-NeuAc 水酸化活性の測定を行った。

タンパク定量

タンパク定量は Smith らにより報告された BCA 法に従い⁽²²⁾、ウシ血清アルブミンを基準にして求めた。

第4節 考察と総括

CMP-NeuAc 水酸化反応は少なくとも 3 つのタンパク性の因子を含む電子伝達系を介していると予想されていたが、これらを DEAE-Sephrose およびリン酸セルロースカラムを用いて、お互いに他の 2 つの因子を含まないようにそれぞれの画分として分離することに成功した。これは、これらの因子の性質を明らかにしてゆくとともに、複数の因子により触媒されているこの反応の反応機構を知る上で非常に重要な知見であると考えられる。つまり、この反応は実際に変換を行う CMP-NeuAc 水酸化酵素の他にも様々な因子が関与しており、これらの分離によりこの酵素反応と電子伝達系の構成因子の関連が明らかとなった。

マウス肝臓サイトゾール画分に、その他のタンパク性の因子を加えずに CMP-NeuAc 水酸化活性を測定すると、活性はみられるものの、この活性は少なく、ここに外部から可溶型の b_5 を加えることにより活性が大きく上昇する。このことは一見、この反応の律速段階が b_5 の発現であること示唆しているようにも考えられる。ところで、実際に b_5 が関与する脂質代謝などその他の反応においては、 b_5 により電子を供給される反応の末端酵素が律速段階酵素であり、 b_5 は多くの酵素に電子を受け渡すことができる因子であると考えられてきた。また、膜結合型の分子種の様々な組織での発現からも b_5 は律速段階酵素ではないことが予想される。また、これまで CMP-NeuAc 水酸化酵素の発現の有無が NeuGc 合成の調節点であると以前から考えられてきた。はたして、この水酸化反応において、主な調節点となっているのが可溶型の b_5 の発現であるのか、また、マウス肝臓に大量に存在する膜結合型の b_5 が何らかの方法により可溶型の CMP-NeuAc 水酸化酵素に利用されているのかは興味の持たれる点である。

ここで得られた3つのタンパク質性の画分のうち b_5 は非常に少量であったため、その後の実験においてはマウス肝臓サイトゾール画分にみられる b_5 活性を補える画分として精製されたウマ赤血球由来の可溶性 b_5 を使用している為、この反応が利用している b_5 分子種に関する問題に対する解決はなされていない。

ここではまず、得られた画分を用いてそれぞれの因子の性質を調べた。これらの因子のうち P11 結合画分は NADPH より NADH を電子の供給源とした方が効果的に b_5 を還元でき、塩の存在下で b_5 への電子伝達が阻害されるという性質を示し^(23, 24)、この因子は可溶性の NADH 依存性 b_5 還元酵素であることが予想される。また、ゲル濾過クロマトグラフィーの結果求められた 30kDa の分子量はミクロソーム膜より酸で切り出された可溶性の NADH 依存性 b_5 還元酵素の分子量とも一致する⁽²⁴⁾。しかしその同定はタンパク質を精製してその構造解析を行う必要がある。

今回、CMP-NeuAc 水酸化酵素と b_5 の親和性は K_m 値で $0.15 \mu M$ と強いことがわかったが、 b_5 固定化カラムと水酸化酵素の相互作用はあまり強くなく、活性が遅れて溶出してきたにすぎなかった。このことは、カラムに固定した b_5 は酸化型であるが、実際に得られた K_m 値は還元型 b_5 に対する値で、還元型 b_5 の方が水酸化酵素とより強固に結合するのかもしれない。つまり、今回の実験で基質存在下で水酸化活性がアフィニティークラムから遅れて溶出してきたことから CMP-NeuAc 水酸化酵素は基質である CMP-NeuAc と結合することではじめて b_5 と相互作用でき、この反応においては基質、酵素と b_5 の三者の複合体形成が必要であることが明らかとなった。しかし、この複合体に参加する b_5 は酸化型で、その後 b_5 還元因子により還元されるのかそれとも還元型の b_5 が元々複合体形成に関与しているのかは明らかではない。今回作製された b_5 アフィニティークロマトグラフィーは、特異的に b_5 と結合するタンパクの精製に利用できると考えられ、また、結合の特異性が CMP-NeuAc 存在下でのみ結合するという性質を利用して共同研究者らにより CMP-NeuAc 水酸化酵素の精製が行われた⁽⁴²⁾。

今回観察された b_5 と CMP-NeuAc 水酸化酵素との相互作用の結果、この水酸化反応機構に関する以下のような仮説が導かれた。すなわち、CMP-NeuAc 水酸化反応の始まりはマウス肝臓のサイトゾール画分に存在する CMP-NeuAc と CMP-NeuAc 水酸化酵素との相互作用である。両者が結合した複合体は b_5 と三重コンプレックスを形成する。つぎに、水酸化酵素が CMP-NeuAc から CMP-NeuGc への変換を触媒し、産物の CMP-NeuGc が遊離するとともに水酸化酵素、 b_5 の解離が起こり、これらの因子は次のサイクルに進む。この反応の阻害剤である塩は b_5 と水酸化酵素の相互作用を阻害する。(Fig.1-7) 一方、この反応の阻害剤であるアジドはこの相互作用は全く阻害せず、CMP-NeuAc 水酸化酵素の触媒を阻害していることが予想される。

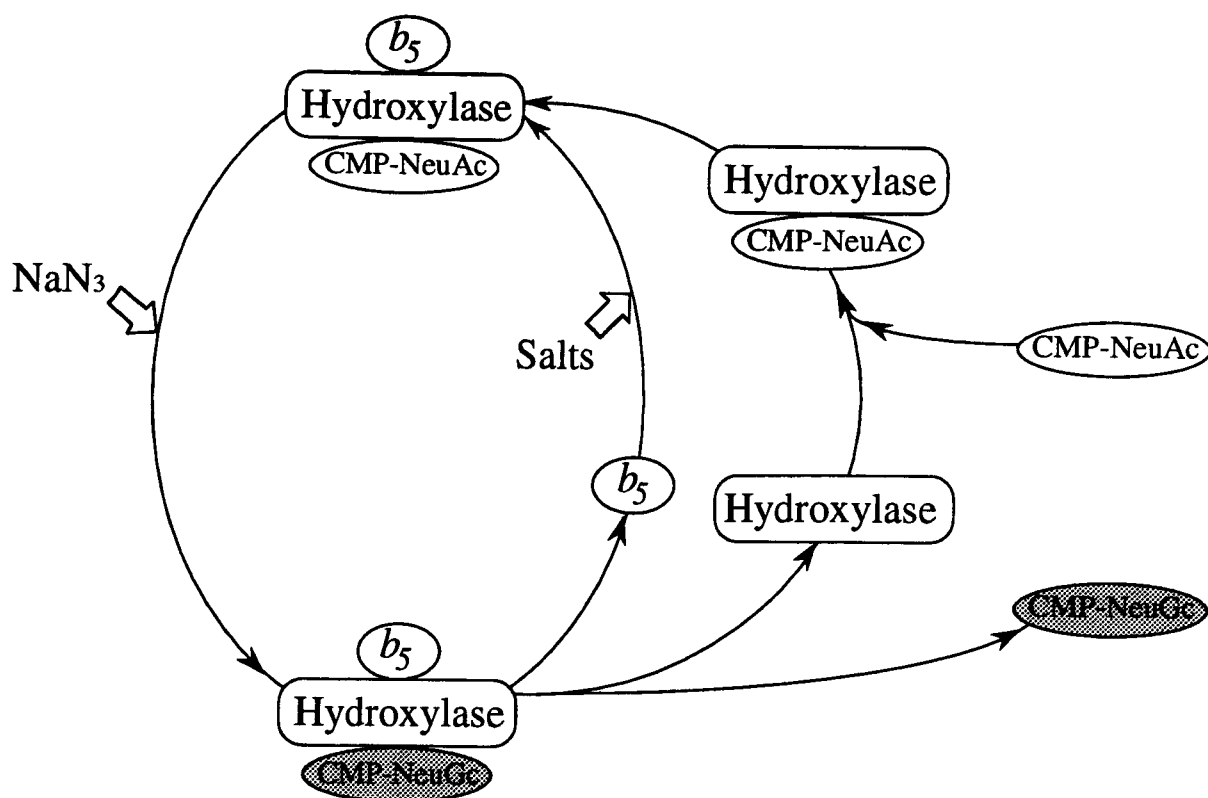


Fig. 1-7. The proposed reaction mechanism for CMP-NeuAc hydroxylation. Hydroxylase, CMP-NeuAc hydroxylase; b_5 , cytochrome b_5 . Open arrows denote the possible sites where CMP-NeuAc hydroxylation were blocked by each inhibitors.

ここであげられた反応機構は元々全て可溶型の因子として予想されていたものであるが第3章で示すようにマウス肝臓において利用されている b_5 は膜結合型であることが考えられ⁽¹⁹⁾、すなわち、CMP-NeuAc水酸化反応は b_5 とともに b_5 還元酵素も膜結合型を利用している可能性がある。しかし、これまで、可溶型の因子が膜結合型の b_5 を利用しているという報告はなく、赤血球において可溶性のメトヘモグロビンの還元是可溶型 b_5 の関与が知られているのみで⁽²⁵⁾、可溶型の酵素がER膜状の b_5 と相互作用する機構に関しては明らかとなっておらず、非常に興味をもたれるところである。

以前、CMP-NeuAc水酸化反応は塩もしくはアジドの存在下で阻害されることが示されている。これらの阻害点はそれぞれNADHから b_5 への電子の伝達と末端酵素のモノオキシゲナーゼ反応であると考えられていた⁽¹⁷⁾。しかし、 b_5 の還元に対する阻害は部分的であり、実際に水酸化反応が阻害されるほどではなくそのほかにも塩で阻害される反応段階の存在が予想されていた。今回、CMP-NeuAc, CMP-NeuAc水酸化酵素そして b_5 の三重コンプレックス形成が塩の存在下で完全に阻害されることが明らかとなり、塩はこの反応の異なる二つの作用点で阻害的に働くことが明らかとなった。

第2章 シトクロム b_5 の生合成機構の解明

シトクロム b_5 (b_5) は NADH からの電子を NADH- b_5 還元酵素の補酵素 FAD を経て受け取り、各種のシアン感受性末端酵素に供給することで脂質代謝を代表とする多くの生体内の反応に関与している重要なヘムタンパク質であることが知られている^(26, 27, 28)。 b_5 より電子を受け取った各種末端酵素は、この電子と分子上酸素を用いて脂肪酸の不飽和化などの脂質代謝系でモノオキシゲナーゼ型の反応を触媒する。また、当教室のこれまでの研究により、 b_5 は CMP-N-アセチルノイラミン酸水酸化酵素反応 (CMP-NeuAc 水酸化反応) にも関与していることが明らかとされている^(16, 17)。

動物においては、この b_5 は 2 種類の分子種を持つことが知られている。すなわち、134 アミノ酸よりなり、肝臓を始めとする種々の組織の ER 膜に局在し、主に脂質代謝に関する膜結合型のもと、98 アミノ酸で構成され、赤血球のサイトゾールにはほぼ発現が限られており、メトヘモグロビン還元に関与する可溶型のものである。これら 2 種類の b_5 は N 末端側に存在する触媒部位では高度に保存された一次構造を持つが、可溶型 b_5 は、膜結合型 b_5 の ER 膜移行シグナルを含む膜結合部位を欠き短くなったもので、さらに、その 98 番目の C 末端残基のみで膜結合型の第 98 残基からのアミノ酸置換が起こっている。このアミノ酸置換には 3 通りの型が知られている。ヒト、ウサギなどではスレオニンがプロリンに、また、ウマ、マウスなどではスレオニンがセリンに置換されており、そのほかに、ウシでは置換が起こらず膜結合型が短くなっただけの構造をしている^(29, 30)。(Fig. 2-1)

この章では、これらの特殊な構造多様性を持つ b_5 の生合成を明らかにし、また、これらの発現を区別して検出する目的で、cDNA の単離が行われているウサギ膜結合型 b_5 の情報を利用して PCR 法を用い、まず、可溶型 b_5 cDNA の単離を行い、次に遺伝子の単離を行った。これらの結果から、 b_5 の生合成機構を明らかにした。

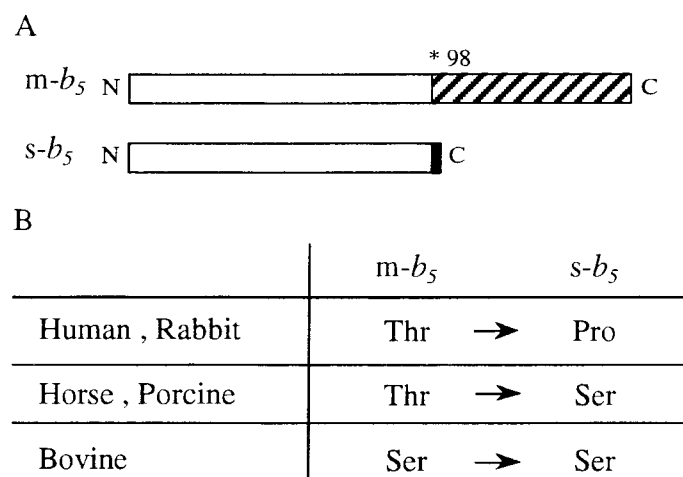


Fig. 2-1. A: Schematic structure of two forms of cytochrome b_5 protein. The open box shows the catalytic domain and the box filled with stripe shows membrane bound domain of cytochrome b_5 . *shows the 98th residue of the protein. **B: The comparison of 98th residue of each forms of cytochrome b_5 s.** There are three types of change in C-terminus of soluble form cytochrome b_5 .

第1節 RT-PCR法を用いたウサギ可溶型シトクロム b_5 のcDNAの検出

マウス肝臓のサイトゾール画分を用いた再構成実験により CMP-NeuAc 水酸化反応には、 b_5 の関与が示唆されていた^(16,17)。しかし、 b_5 にみられる二つの分子種のうちどちらがこの反応に関与しているかは明らかにはされていない。そこで、これを明らかにするために、まず、これらを区別して検出することが必要である。このため、著者はこれらのうちクローニングの行われていなかった可溶型 b_5 のクローニングを行った。

この b_5 の cDNA クローニングは Steggles らにより精力的になされておりヒト及びウサギの膜結合型 b_5 の cDNA が単離されていた^(31,32)。そこで著者はこの情報に基づき、膜結合型と、可溶型の二種類の mRNA が共通の塩基配列を利用している可能性を考え、ウサギ膜結合型 b_5 に対するプライマーを作製し、RT-PCR 法を用い、可溶型 b_5 の存在の知られる赤血球の前駆細胞の網状赤血球での検出を試みた⁽³¹⁾。図に示したのはプライマー RB5-1 と RB5-2 の RT-PCR の結果で、網状赤血球では膜結合型で予想される 360bp より少し長い PCR 産物の増幅がみられた。(Fig. 2-2) この産物をさらに解析すると、少し長い増幅産物は、基本的には膜結合型と同一の塩基配列を持っているものの、膜結合型の mRNA の触媒ドメインと膜結合ドメインの境界部分に 24 塩基の挿入配列がみられ、この挿入配列が可溶型に特異的なカルボキシル末端の 2 つのアミノ酸残基と終止コドンコードしていることが明らかとなった。(Fig. 2-3) このことより、可溶型 b_5 は膜結合ドメインの前に挿入された終止コドンを含む 24 残基により膜結合ドメインを欠く構造をしていることが予想された。

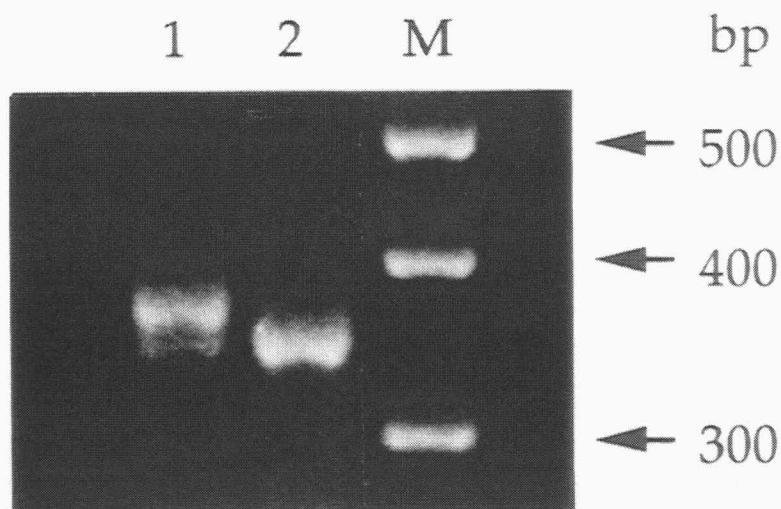


Fig. 2-2. Agarose gel electrophoresis of the cDNA segments of rabbit cytochrome *b₅*, amplified by the polymerase chain reaction. Lane 1, the amplified product from reticulocyte mRNA; lane 2, the amplified product from liver mRNA; M, the molecular weight markers. PCR was carried out as described under "Experimental Procedures" using RB5-1 and RB5-2 as primers.

第2節 RACE法を用いたウサギ可溶性シトクロム *b₅* cDNA の単離

ここで得られたPCR産物は翻訳領域内の一部分であったため、これが偽遺伝子ではなく本当に全長のcDNAに相当するかを調べるために、RACE法(迅速cDNA増幅法、Rapid Amplification of cDNA Ends)を用いて、5'、3'側の非翻訳領域を含むcDNAの一次構造を確かめた。これより、24塩基の挿入配列を除いて、非翻訳領域を含む全ての領域で膜結合型と可溶性のmRNAは同一であることが確認された。

```

mb5 cDNA taggcttctgggttcagcctgtagagcactagccattgtgaccatttggggaatgtccc
mb5 cDNA gggcgacgtgggttagacgcttgccccgctccaccggtagcgtgtgagtgagggcct

sb5 A.A. M A A Q S D K D V K Y Y T L 14
sb5 cDNA tccgcctcgtgcagagATGGCTGCGCAGTCAGACAAAGACGTGAAGTACTACACCCTA 58
mb5 cDNA ggtccgcctcgtgcagagATGGCTGCGCAGTCAGACAAAGACGTGAAGTACTACACCCTA
RB5-1

sb5 A.A. E E I K K H N H S K S T W L I L H H K V 34
sb5 cDNA GAAGAGATTAAGAAGCACAAACACAGCAAAAGCACCTGGCTGATCCTGCACCACAAGGTG 118
mb5 cDNA GAAGAGATTAAGAAGCACAAACACAGCAAAAGCACCTGGCTGATCCTGCACCACAAGGTG

sb5 A.A. Y D L T K F L E E H P G G E E V L R E Q 54
sb5 cDNA TACGATCTGACCAAATTTCTGAGGAGCACCCCTGAGGGGAGGAAGTCCTGAGGGAACAA 178
mb5 cDNA TACGATCTGACCAAATTTCTGAGGAGCACCCCTGAGGGGAGGAAGTCCTGAGGGAACAA

sb5 A.A. A G G D A T E N F E D V G H S T D A R E 74
sb5 cDNA GCTGGGGGCGATGCCACTGAAAACTTTGAGGACGTCGGGCACTCGACAGATGCCAGAGAG 238
mb5 cDNA GCTGGGGGCGATGCCACTGAAAACTTTGAGGACGTCGGGCACTCGACAGATGCCAGAGAG

sb5 A.A. L S K T F I I G E L H P D D R S K L S K 94
sb5 cDNA CTGTCCAAGACCTTCATCATCGGGGAGCTGCACCCGGATGACAGATCAAAATTGAGCAAG 298
mb5 cDNA CTGTCCAAGACCTTCATCATCGGGGAGCTGCACCCGGATGACAGATCAAAATTGAGCAAG

sb5 A.A. P M E P * 98
sb5 cDNA CCTATGGAACCTTAAaggtgtgtttcaaggaaactcttatcaccaccgtcgattccaat 358
mb5 cDNA CCTATGGAA-----ACTCTTATCACCACCGTCGATTCCAAT
RB5-2

sb5 cDNA tccagctggtggaccaactgggtgatccccgccatctccgcctgatcgtg 418
mb5 cDNA TCCAGCTGGTGGACCAACTGGGTGATCCCCGCCATCTCCGCCCTGATCGTGGCACTGATG

mb5 cDNA TATCGCCTCTACATGGCCGACGACTGAgccctcccagcagccgtgcaagaaaagacggc
mb5 cDNA ctgggacaaggggcagaagcagcctctgctaatactcagctgacagaaaccttcacctg
mb5 cDNA agaaataattgtaatatgtctgtttccctttcttcctatgttagaagcaaacagaactc
mb5 cDNA ttctgttctttctactcttgaactttgctatgtgcctttttatccatcgactttgatgtt
mb5 cDNA tcttcagcatgtaatttacgtattgttaacatgatcttttaaaaaaatatatctggcttt
mb5 cDNA taaaatattccgcccatactgacgggctccaggagtcgtcgccaccaatccccatatgga
mb5 cDNA aaccgtcgatattcagccatgtgccttcttccgctgcagcagatggcgatggctggtt
mb5 cDNA ccatcagttgctgtgactgtagcggctgatgttgaactggaagtcgccgcgactggt
mb5 cDNA gtcccca

```

Fig. 2-3. Nucleotide sequence of one of the rabbit soluble cytochrome b_5 cDNAs (sb_5 cDNA) and the deduced amino acid sequence. The sequences are shown together with the nucleotide sequence of rabbit liver microsomal cytochrome b_5 cDNA (*) (mb5 cDNA). In the other polymorphism-derived sb_5 cDNA not shown here, C is at base positions 303 and 425, respectively. The sequence of the open reading frame is shown by uppercase letters and that of the noncoding region by lowercase letters. The primers used for PCR on Fig. 2-2 are underlined.

第3節 ウサギ肝臓遺伝子ライブラリーからのシトクロム b_5 遺伝子の単離

そこで、この両者の mRNA がどのような機構により合成されるのかを明らかにするためにウサギ b_5 遺伝子を単離することを試みた。まず、ウサギ肝臓ゲノム DNA をもとにラムダ FIX II をベクターとし、ゲノム遺伝子ライブラリーを作製した。ここで、 b_5 は mRNA に転写されるもの、されないものを含めて多数の偽遺伝子を持つことが明らかにされている⁽³³⁾。このためスクリーニング用のプローブにはこれら偽遺伝子とのハイブリダイゼーションを避けるため、ウサギゲノム DNA をエキソン部分の PCR プライマー RB5-3 と RB5-4 で増幅したゲノム遺伝子のイントロンの断片を使用した。(Fig. 2-4) ウサギ肝臓由来ゲノム遺伝子ライブラリーの 5×10^5 個のクローンをスクリーニングした結果、3 個の陽性クローンが得られた。これらの制限酵素地図やエキソン部位の解析により、これらのクローンはお互いに部分的にオーバーラップしており合計約 20kb に及び、それぞれ図のように第 1 エキソンを除き、第 2 エキソンから 3' 末端のポリ A 付加シグナルまでの b_5 の遺伝子を含んでいることが明らかとなった。(Fig. 2-4) また、これらのエキソン-イントロン構造は全て GT-AG 則に従っていた。(Table 2-1) また、可溶型 b_5 に特異的な 24塩基の挿入配列は一つのエキソンとして存在しており、膜結合型と可溶型 b_5 は一つの遺伝子から選択的スプライシングにより合成されていることが示唆された。(Fig. 2-4)

exon	exon length	splice donor	intron	intron length	splice acceptor
1	>200bp	not identified	1	>21kb	aaacagCACCCCT
2	129bp	CACCCGgtacag	2	1kb	ttgcagGATGAC
3	30bp	CCTATGgttaagt	3	2.5kb	tgtcagGAACCT
4	24bp	TTCAAGgttggt	4	1kb	ttctagGAAACT
5	35bp	TTCCAGgtatgt	5	1.2kb	ttgcagCTGGTG
6	460bp+polyA				

Table 2-1. Exon and intron organization of the cytochrome b_5 gene.

The nucleotides surrounding the splice donor and acceptor sites for each of the six introns are indicated. The sequences conforming to the GT-AG rule are underlined. Exons are shown in uppercase letters and introns are shown in lowercase letters. The length of exons are confirmed by sequencing and introns are deduced by Southern blotting and PCR analysis.

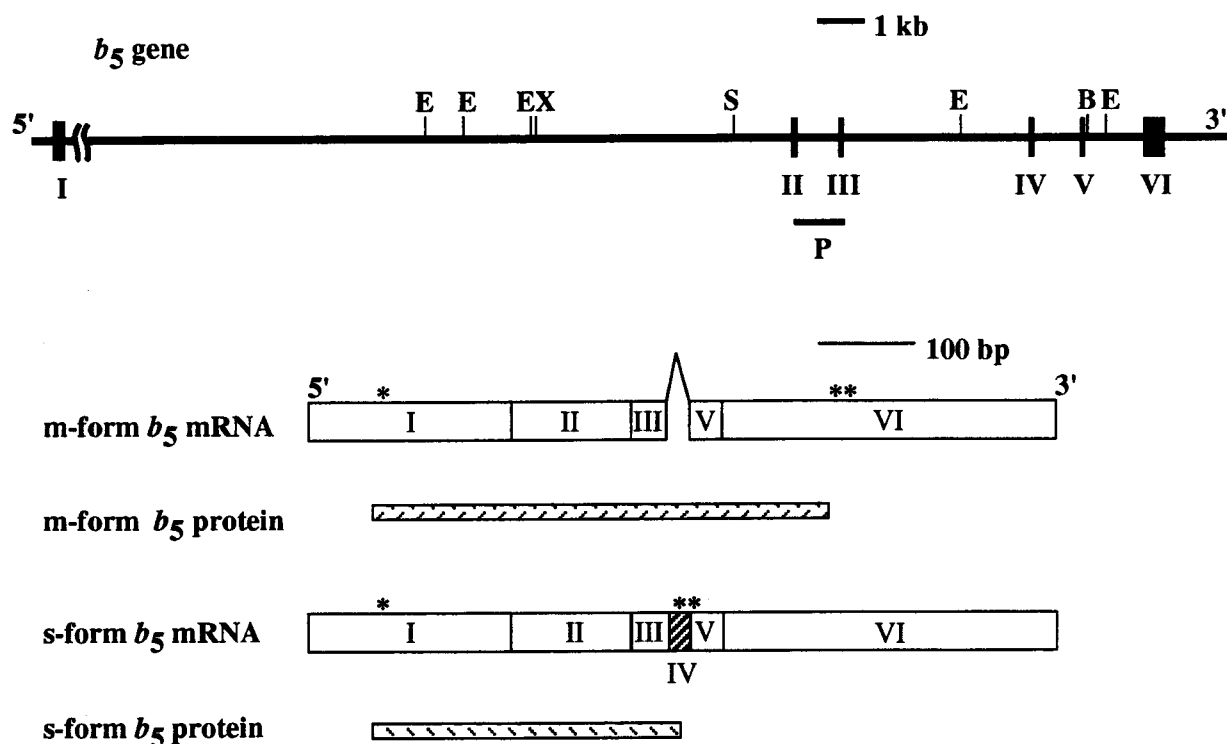


Fig. 2-4. Biosynthesis of two forms of rabbit b_5 s. The structure of isolated rabbit b_5 gene is illustrated at the top of the figure, in which exons are indicated with closed boxes and the restriction enzyme sites are indicated by the letters B, E, S, and X for Bam HI, Eco RI, Sal I, and Xba I, respectively. P indicates the probe used for screening. * and ** denote the location of start codon and stop codon, respectively. Details are described in the text.

第4節 実験方法

実験材料

核酸の標識に用いた [α - 32 P] dCTP (>3000Ci/mmol) と [γ - 32 P] ATP (>4000Ci/mmol) は ICN Radiobiochemical 社より購入した。また、PCR に使用した Taq DNA polymerase は Promega 社のものを利用した。Murine Molony Leukemia Virus 由来の逆転写酵素は BRL より購入した。アガロースゲル電気泳動のマーカーには Pharmacia の 100bp ladder を使用した。また、ゲルより DNA を抽出する際には Geneclean Kit (bio 101) を使用した。そのほか遺伝子工学的な実験に必要な試薬はタカラ、東洋紡、日本ジーンから購入した。

動物

ウサギは New Zealand white (清水実験材料) の雄を使用した。

網状赤血球の単離

網状赤血球は健康な状態でも血液中にある程度存在することが知られているが、ヒドラジンで貧血を誘発することでさらに血中濃度が上昇することが知られている⁽³⁴⁾。そこで、一週間ウサギにフェニルヒドラジンを皮下投与し、3日後に心臓より採血を行った。ここには白血球が含まれているので、これを Sigmacell 樹脂に吸着させリンパ球血小板を含まない網状赤血球画分を得た。

PCR プライマー

PCR プライマーはウサギ膜結合型 b_5 の cDNA の情報より⁽³¹⁾ これに対して作製した。作製したプライマーとその cDNA 上の位置を以下に示す。また、これらのプライマーについては産物をサブクローニングするために端に制限酵素部位を付加してある。

RB5-1	5'-GCCTCCTGCAGAGATGGCTGCGCAGTCA-3'
RB5-2	5'-CCAGTGGATCCACCAGCTGGAATTGGAATCGA-3'
RB5-3	5'-CACGAATTCGCGGAGGAAGTCCTGAGGGA-3'
RB5-4	5'-CCAGAATTCTGCTCAATTTTGATCTGTCAT-3'
オリゴ dT	5'-TTTGCATGCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

これらのプライマーは全て Applied Biosystem Inc. の DNA 合成機 391A を使用した。

RNA の単離

各臓器からの RNA の単離は AGPC (Acid Guanidium phenol chloroform) 法に従い行った⁽³⁵⁾。各組織から単離した total RNA は 260nm での吸光度により定量した。

PCR 条件

PCR は ATTO の Zymoreactor もしくは岩城の Thermal Sequencer を使用した。また、反応は RT-PCR の場合、total RNA をランダムヘキサマーと MMLV 由来の逆転写酵素を用い cDNA に逆転写したものをを用い、この一部を最終用量 50 μ l の反応液に加え、これをまず、94℃で1分間加熱した後、94℃で45秒間変性させ、これを 50℃で1分間アニーリングさせ、その後 72℃で1.5分間伸長反応を行うという変性、アニーリング、伸長を 30 回繰り返し、最後に 72℃で伸長を完成させるためにさらに2分間伸長反応を行う。ここで、プライマーは 20p モル加えている。この PCR 産物はアガロース電気泳動で分離し、紫外線下エチジウムブロマイドの蛍光を用いて検出している。

また、RACE法では逆転写反応を行う際に使用するプライマーを、5'末端を増幅する際には b_5 特異的なアンチセンスプライマーを使用し、この逆転写物を Terminalnucleotidyl Transferase と dATP を使用し cDNA の 3' 末端にポリ A の付加を行う。3' 末端を増幅する際には逆転写反応を行う際にはオリゴ dT プライマーを使用する。このポリ A 配列と既知の内部のプライマーとで PCR することにより各末端が増幅できる。この時、1 度の PCR で特異的な増幅産物が有意にみられないときは、内部のプライマーのより末端側に新しいプライマーを作製しこれを用いて先の産物を増幅した⁽³⁶⁾。

プラスミドベクターへのサブクローニングと塩基配列決定

PCR 産物は解析の際に、まず、プライマーの末端につけた制限酵素で切断し、これを M13、または pBluescript II (Stratagene) に組み込みこれを解析に使用した。

塩基配列決定には dideoxy 法を用い、T7 DNA polymerase と [α -³²P] dCTP を用いた Sequenase Ver. 2 キット (U.S.B.) もしくは dideoxyNTP に入れた蛍光色素と Taq DNA polymerase の組み合わせを利用した Cycle Sequence Kit (Applied Biosystem Inc.) を利用した。

ゲノム DNA の単離

比較的長鎖の DNA が単離できるという常法に従い⁽³⁷⁾ ウサギ肝臓から単離した。この方法では液体窒素下で凍結した組織をまず、乳鉢ですりつぶし、個々の細胞に分離し、これをプロテイナーゼ K で消化し細胞を溶解する。その後、混在する RNA を RNase で分解した後、フェノールなどの有機溶媒で抽出し、最終的にエタノール沈殿を行う。単離した DNA は 0.4% アガロース電気泳動することによりその長さを確かめており、平均して約 200kb のものを以下の実験に使用している。

ゲノム遺伝子ライブラリーの作製

単離されたウサギ肝臓ゲノム DNA を制限酵素 *Sau* 3A I で部分消化しショ糖密度勾配遠心により 20-50kb の画分を分離した。これを Klenow Fragment で部分的に突出末端を埋め、ラムダ DNA のラムダ FIX II ベクターも制限酵素 *Xho* I で消化したものを埋め、ともにセルフライゲーションしないようにして、4℃一晩でベクターとインサートのライゲーションを行った。(Partial fill-in 法) こうして得られたライゲーションの終わったラムダ DNA はベクターを含めて 50kb 以上ないとパッケージングできないために、長い挿入断片が得られることの知られる Gigapack II XL (Stratagene) で *in vitro* パッケージングし、ウサギゲノム遺伝子ライブラリーを得た。このライブラリーの挿入断片の平均長は約 20kb であった。スクリーニングには、増幅していないライブラリーを用いた。

スクリーニング

上で得られたライブラリーを合計 5×10^5 個培地にまき、これをニトロセルロース膜 (S&S) に転写し、常法に従い⁽³⁸⁾、ブラクハイブリダイゼーション法を用いたスクリーニングを行った。ライブラリーの宿主の大腸菌には XL-I Blue MRA 株 (Stratagene) を用いた。スクリーニングの際のプローブには cDNA 部分の塩基配列をもとに作った PCR プライマーでイントロンを増幅したもので、この中に約 2kb のイントロンを含むゲノム断片を用いた。これは先に示したプライマー RB5-3 と RB5-4 の組み合わせでゲノム DNA より得られた PCR 産物であり、これをプラスミドベクターに組み込み、このインサートをゲルより抽出してランダムラベリングキット (タカラ) と [α - 32 P] dCTP を使用して標識した。

サザンブロッティングを用いたラムダクローンの解析

スクリーニングの結果得られた陽性クローンは常法に従い DNA を単離し、これらを制限酵素 *Bam*HI、*Eco*RI、*Sal*I、*Xba*I で消化し、アガロース電気泳動し、ゲルより Vacume Blotting Unit (LKB) を使用し、Hybond N⁺ (Amasham) ナイロン膜に転写した。プローブには cDNA の情報をもとに作製したプライマーの 3' 末端を T4 polynucleotide kinase と [γ - 32 P] ATP で標識したものを使用した。このサザンブロッティングの結果をもとにラムダクローンの制限酵素地図とエキソンの分布を明らかにした。また、個々で得られた制限酵素及びエキソンの地図は部分的に消化しプラスミドベクターに組み込み、これを、PCR または塩基配列決定することで確かめた。

遺伝子バンク

ここで単離し、塩基配列を決定したものは以下の登録番号で DDBJ、EMBL、GenBank の各核酸塩基配列バンクに登録されている。

ここで、ウサギシトクロム b_5 の遺伝子断片に関しては全ての領域を塩基配列決定することはず、エキソン部分だけを決定したため 5 つに分かれている。

ウサギ可溶型シトクロム b_5 の cDNA D10900

ウサギシトクロム b_5 の遺伝子断片 D38567 D38568 D38569 D38570 D38571

第5節 考察と総括

b_5 はタンパク質化学的によく調べられてきた酵素であるが、これらは、膜結合型の分子種を人為的にトリプシンなどのプロテアーゼでER膜より切り出し、可溶型として性質が調べられてきた。このため膜結合型、可溶型の二種類分子種の発現に関しては、膜結合型がプロテアーゼで切断されて可溶型ができる、異なる遺伝子に由来する、そして同じ遺伝子の産物でここから二種類のmRNAができるあるなどの諸説があったが、直接的な証明はなされてはいなかった。しかし、この研究により哺乳動物においては同じ遺伝子より転写され組織特異的な選択的スプライシングによりこれら二つの分子種は異なる発現調節を受けていることが明らかとなった。

著者の研究と時を同じくしてStegglesらの研究室でもヒトの網状赤血球細胞のcDNAライブラリーより可溶型 b_5 のcDNAを単離しており、ヒトでも可溶型に特異的な24塩基からなる挿入に含まれる終止コドンにより膜結合部位を欠いたアイソフォームの発現が起こることが示された⁽³⁹⁾。このことは哺乳動物では共通の発現調節機構が存在することを示唆している。

また、膜結合型の第98残基と可溶型でカルボキシル末端が同じプロリンであるウシにおいては、Stegglesらの単離したゲノム遺伝子も著者の単離したウサギの遺伝子とエキソン-イントロン結合部などは完全に一致しており、可溶型特異的なエキソンに相同性を持つ24塩基からなる配列はみられた。しかし、ウシの場合では可溶型特異的なPCRプライマーを使用しRT-PCRを行っても可溶型の増幅産物は得られなかった。このため、この可溶型特異的なエキソンをさらに解析したところ、このエキソンの持つステム-ループ構造の不安定さが原因で、この可溶型特異的なエキソン類似配列を持つにもかかわらず、実際には可溶型特異的なスプライシングは起こっていないことが予想された。従って、ウシ赤血球においては膜結合型 b_5 がプロテアーゼにより切断されて可溶型となっている可能性が示唆された。他の動物種では可溶型のカルボキシル末端のみは膜結合型と異なるアミノ酸残基を持っているがウシでは両者が同一であることはこの可能性を示唆している⁽⁴⁰⁾。また、 b_5 は動物種間で非常に保存されていて、ホモロジーの高いタンパク質であることが知られており、このようなタンパク質がウシだけで異なった発現機構を持つようになったことは非常に興味深い。

また、第3章で示すように、マウスのcDNAをウサギとのホモロジーを利用してPCR法で増幅した断片を解析すると、ウサギやヒトとは異なり可溶型特異的なエキソンは19塩基からなり、カルボキシル末端残基はプロリンではなくセリンに変化していた。このことより第98残基がスレオニンからプロリンに変化しているウサギ、ヒトは可溶型特異的

な24塩基のエキシソンの挿入がおこり、セリンに変化しているマウス、ウマでは19塩基の挿入が起こっていることが推定される。

これまで可溶型 b_5 は赤血球系の細胞だけに発現していると考えられてきたがGiordanoらはこの組織以外にも肺、胆嚢、副腎にこのmRNAの発現を見いだしている⁽⁴¹⁾。しかしこれまで可溶型の b_5 と相互作用できる可溶性の因子は赤血球のメトヘモグロビンとCMP-NeuAc水酸化反応以外には報告されておらず、これらの組織でどのような働きをしているのか興味を持たれる。

ここで行ったRACE法による5'非翻訳領域の解析により、可溶型と膜結合型の転写開始点は同一であることが予想され、少なくとも、ウサギの肝臓と網状赤血球においては、転写時には特に異なった調節は受けていないことが予想される。

可溶型 b_5 の発現は限られた細胞だけにみられるがこの発現調節は赤血球特異的な選択的スプライシング因子の存在により制御されていると考えられ、この因子がハウスキーピング遺伝子である b_5 遺伝子より転写されたhnRNAを膜系を持たない赤血球にふさわしい可溶型にするために赤血球特異的に膜結合ドメインを欠く構造に変えているものと思われる。現在、まだ、選択的スプライシングの分子機構は十分明らかとなっていないが、ここで見られたように赤血球系に特異的な選択的スプライシング因子が存在し、転写レベルとは異なった機構で、赤血球系の分化の様な細胞の変化に対応して、様々な遺伝子の選択的スプライシングに関与していることが予想され、このほかにも赤血球系で特異的に選択的スプライシングを受ける遺伝子があるかどうか、また、あるならばこれらが b_5 の可溶型特異的エキソンの直前のイントロンに対して相同性を示すかどうかは非常に興味をもたれるところである。

これら両者はシグナル配列を持たないために、遊離のリボゾームで合成され、膜結合型の分子種については、合成後にこれの膜結合ドメインに含まれるER膜移行シグナルでサイトゾールからER膜に移行されることが予想される⁽⁵²⁾。また、可溶型の分子種はそのままサイトゾールにとどまっていることが考えられる。

また、ヒトでは可溶型 b_5 の欠損症であると考えられる疾患がある。これは、メトヘモグロビン血症が知られているが⁽⁵⁰⁾、これは、選択的なスプライシングまたは、可溶型特異的エキソンの不全によることが予想される⁽⁵¹⁾。

第3章 CMP-N-アセチルノイラミン酸水酸化反応に関与する シトクロム b_5 分子種の同定

先に示したように膜結合型の b_5 の mRNA に組織特異的な選択的スプライシングで挿入された配列の影響で、膜結合部位を欠く可溶型 b_5 が生合成される。つまり、これらはこの挿入配列に注目するとお互いを区別して検出できることが明らかとなった。CMP-NeuAc 酸水酸化反応は、その b_5 源として、マウスサイトゾール画分に微量存在しており^(16, 17)、実際に再構成系の実験に使用してきた可溶型の分子種か、ER 膜に豊富に存在し、多数のシトクロム P450 系のモノオキシゲナーゼ反応に関与していることが示されている膜結合型の分子種かのどちらかを利用しているかを明らかにする目的で、まず、これまで解析のなされていなかったマウスの両分子種の cDNA のクローニングを行い、ここで得られた情報をもとに b_5 の両分子種のマウス肝臓での分布を明らかにした。また、この結果、膜結合型の b_5 が関与していることが予想されたので、この膜結合型 b_5 が実際に今まで示してきた可溶性の再構成系において CMP-NeuAc 水酸化反応に関与できるかを明らかにした。

第1節 RT-PCR 法による二種類のマウスシトクロム b_5 の cDNA の単離

b_5 は種間で非常に高いホモロジーを持つタンパクとして知られている⁽²⁹⁾。そこで、先にウサギに対して作製した PCR プライマーを使用して、ホモロジーを利用してマウスの cDNA を単離することを試みた。先の章で明らかとなったように、ウサギの赤血球系細胞は、組織特異的なスプライシングの結果、膜系を持たない赤血球にふさわしい可溶型の b_5 分子種を作っている。マウスでも同様の調節機構が働いているものと考え、血球系の細胞も多く含まれているマウス脾臓より RNA を単離し、これを用いて RT-PCR を行った。この結果、予想通り、マウス脾臓には大量の膜結合型と少量ではあるが可溶型の発現がみられた。これらのバンドをそれぞれ切り出し、プラスミドベクターに組み込み、塩基配列を明らかにした。

この配列とウサギの配列を比較すると今まで提唱されてきた種間の高いホモロジーは翻訳領域のみであり、非翻訳領域にまで有意なホモロジーは見られなかった。このため、これらの翻訳領域の全長の塩基配列を決定するために、ここでも、RACE 法による解析をさらに行った。(Fig. 3-1)

マウスにおいても、可溶型 b_5 の cDNA には、膜結合型 b_5 の cDNA にはない可溶型特異的な挿入配列が存在することが明らかとなった。この挿入配列は、全体的にウサギ、ヒトと非常に高いホモロジーを有していた^(20, 39)。ウサギと同じように第 97 と 98 残基と終止コドンにコードしていたが、長さが少し短く、19 塩基からなり、アミノ酸レベルでも調べられていることであるが可溶型のカルボキシル末端はセリンであった。(Fig. 3-2) また、これまで可溶型の b_5 はカルボキシル末端残基のみに異なるアミノ酸残基が置き換わっていると報告されていたが、cDNA クローニングによる一次構造解析により可溶型特異的な配列にコードされているアミノ酸はふたつとも膜結合型とは異なっていることが明らかとなった。

```

      10      20      30      40      50      60
AGACTCACTGTTCCGAGATGGCCGGGCAGTCAGACAAGGATGTGAAGTACTACACCCTGG
      70      80      90     100     110     120
      M A G Q S D K D V K Y Y T L E
AAGAGATTTCAGAAGCACAAAGACAGCAAGAGCACCTGGGTGATCCTGCATCATAAGGTGT
      130     140     150     160     170     180
      E I Q K H K D S K S T W V I L H H K V Y
ACGATCTGACCAAGTTTCTCGAAGAGCATCCTGGTGGAGAAGAAGTCCTAAGAGAGCAAG
      190     200     210     220     230     240
      D L T K F L E E H P G G E E V L R E Q A
CTGGGGGTGATGCTACCGAGAATTTTGAGGACGTCGGGCACTCTACGGATGCACGAGAAC
      250     260     270     280     290     300
      G G D A T E N F E D V G H S T D A R E L
TGTCCAAAACATACATCATCGGGGAAGTCCATCCAGATGACAGATCAAAGATAGCCAAGC
      310     320     330     340     350     360
      S K T Y I I G E L H P D D R S K I A K P
CTTCGGAATCTTAAAGGTGTCCAGGATACTCTTATCACTACTGTGGAGTCTAATTCCAGT
      370     380     390     400     410     420
      S E S *           D T L I T T V E S N S S
TGGTGGACCAACTGGGTGATCCCAGCCATCTCAGCCCTGGCTGTAGGTCTGATGTTTCGC
      430     440     450     460     470     480
      W W T N W V I P A I S A L A V G L M F R
CTCTACATGGCAGAAGATTGACTTGTCTCTCCGAAGCCGAAGAACTAAAAGACTGCCCCA
      490     500     510     520     530     540
      L Y M A E D *
GAGCGGGGAGAAAAGAAGCCAGTGTTAATCACTTCCACTGACAGAAAACCTCCCCCTGAGA
      550     560     570     580     590     600
      ACGTAAATTGTAATATATCTGTTTCCTTTTCCTCCTGTGCTAGTAGAACAACAAGGGACT
      610     620     630     640     650     660
      CTTTGTACTCTTCAACTTTTCAAATGTGCCTTTTACTCAACTTCATGGTGATGTTTCTT
      670     680     690     700     710     720
      CACTACATAATTTACTTATTGTAAACACGATCTTTTAAATATATCTGGCTTGGTAAA
      GTAAAA

```

Fig. 3-1. Nucleotide sequences and its deduced amino acid of mouse cytochrome b_5 cDNA. Soluble form specific exon are underlined. Microsomal cytochrome b_5 has the deletion of the underlined 19bp. Termination codon of each forms are indicated as *.

	GluSer *
mouse s-form	GAATCTTAAAGG-----TGTCCAG
	••• •••••••••• • •• ••
rabbit s-form	GAACCTTAAAGGCTGTGTTTCAAG
	GluPro *

Fig. 3-2. Comparison between the soluble form (s-form) cytochrome b_5 specific intron sequences between mouse and rabbit. The derived amino acid residues are indicated in the top or bottom of nucleotide sequences in the three letter codes. * shows the termination codon and homologous nucleotide residues between the two species are depicted by •.

第2節 マウス肝臓における二種類のシトクロム b_5 の発現調節

第2章の結果、また可溶型 b_5 特異的エキソンの情報からもわかるように、 b_5 は種間で非常に高いホモロジーを持つ。ここで得られたマウス b_5 の情報をもとにマウス b_5 の可溶型及び膜結合型の両分子種を区別して増幅することができる PCR プライマーを作製し、肝臓及び赤血球由来の RNA を用い RT-PCR 法にて両者の分布を調べた。

プライマー MB5-1 と MB5-2 の組み合わせでは両者の増幅がみられるはずであるが、マウス肝臓においては膜結合型すなわち可溶型の 372bp より 19bp 短い 352bp の膜結合型の分子種のための発現が認められた。また、可溶型のみを特異的に増幅するプライマー MB5-1 と MB5-3 の組み合わせでも全く可溶型の 322bp の産物の増幅はみられなかった。一方、赤血球においては両者の発現がみられた。(Fig. 3-3)

このことは、CMP-NeuAc 水酸化酵素は赤血球では可溶型の b_5 を利用している可能性はあるが、肝臓では何らかの方法で ER 膜に豊富に存在する膜結合型の分子種を利用していることを示している。また、肝臓のサイトゾール画分でわずかにみられた可溶性の b_5 活性は、可溶型の mRNA によらない機構で生じたものであると考えられる。つまり、膜結合型の分子種がそのままサイトゾール画分に存在する、もしくは、ウシで予想されたようにプロテアーゼによる切断を翻訳後調節の形で受けるなどの可能性である。

マウス肝臓には膜結合型のみが存在しないことが示唆されたため、この膜結合型の分子種が再構成系の CMP-NeuAc 水酸化反応に関与できるかを調べることにした。

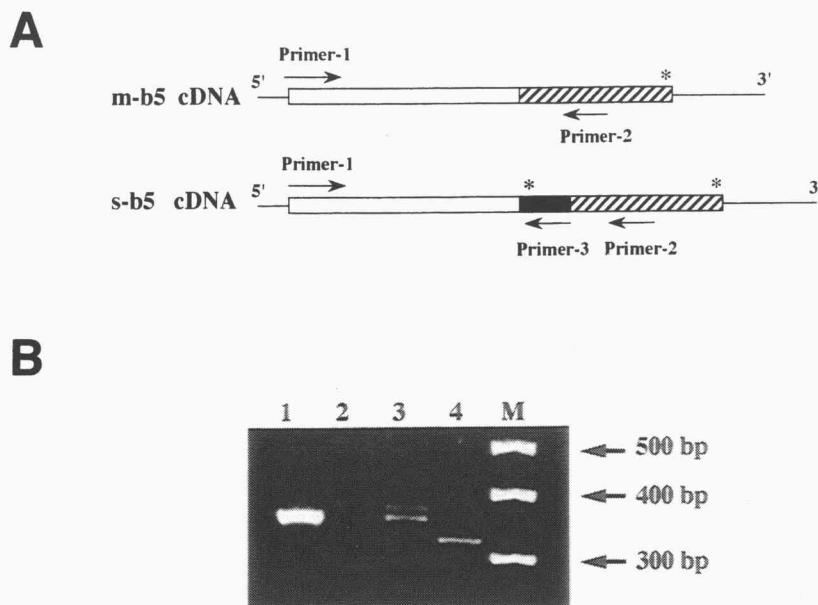


Fig. 3-3. (A) The orientation of oligonucleotide primers used for the amplification of mouse cytochrome b_5 cDNA. $m-b_5$, the microsomal form of cytochrome b_5 (b_5); $s-b_5$, the soluble form of b_5 ; white bars, the coding region for the catalytic domain; black bar, the region specific for $s-b_5$ cDNA; striped bars, the coding region for the membrane-binding domain; solid lines, the 5'- and 3'-noncoding regions of b_5 cDNA; *, termination codon.

(B) Agarose gel electrophoresis of DNA segments of mouse cytochrome b_5 amplified by means of the polymerase chain reaction. The cDNA from liver (lanes 1 and 2), and erythrocytes (lanes 3 and 4) was amplified with primers 1 and 2 (lanes 1 and 3), and primers 1 and 3 (lanes 2 and 4), and the products were analyzed by agarose gel electrophoresis. M, the molecular weight markers.

第3節 再構成 CMP-N-アセチルノイラミン酸水酸化反応に対する 膜結合型シトクロム b_5 、各種リン脂質の影響

これまで、CMP-NeuAc水酸化反応は全て可溶性の因子により行われていると考えられてきたが^(9,16)、マウス肝臓では可溶型 b_5 は存在せず、膜結合型の分子種が CMP-NeuAc水酸化反応に関与していることが予想された。そこで、はたして膜結合型 b_5 が豊富に含まれた肝臓のミクロソーム画分が再構成系の CMP-NeuAc水酸化反応に対して b_5 源として働くかどうかを調べた。

酵素源としてはマウス肝臓のサイトゾール画分を用いた。この画分にはCMP-NeuAc水酸化酵素と b_5 還元因子が含まれており、また、少量であるが可溶型の b_5 も含んでいる。この酵素源に CMP-NeuAc 水酸化反応に必要な因子をそれぞれ加えてゆくと、 b_5 還元因子、水酸化酵素を加えても活性には変化はなかった。ここに肝臓のミクロソーム画分を加えてもわずかな活性の上昇しかみられなかったが、これにさらに界面活性剤である TritonX-100を加えミクロソーム画分の凝集を解くと、可溶性 b_5 を加えた時と同様の有意な活性の上昇がみられた。このことは、適当な界面活性剤のもとで CMP-NeuAc 水酸化反応が膜結合型 b_5 を利用することができることを示唆している。(Table 3-1)

最後に、この界面活性剤の代わりとなる内在性の因子としてこの反応系に各種のリン脂質を加えて反応を行った。すると、ホスファチジルセリンのみがわずかにこのミクロソーム画分の b_5 を利用するために働くことが明らかとなった。(Table 3-2) しかしその他のリン脂質では、ほぼコントロールレベルの活性しか見られなかった。

Table 3-1. Effects of cofactors and the microsomal fraction of mouse liver on the CMP-NeuAc hydroxylation using the cytosolic fraction as the hydroxylase source. The hydroxylation activity of the cytosolic fraction (56.3 μ g protein) was measured under the various conditions listed. Cytosol, the cytosolic fraction; Hyd, the partially purified CMP-NeuAc hydroxylase (14.5 μ units); X, a fraction containing b_5 reducing factor(s) (5.5 μ g protein); s- b_5 , the soluble form of cytochrome b_5 (20 pmol protein); Microsome, the microsomal fraction containing 20 pmol b_5 protein; Triton, Triton X-100 (0.5%). The data are presented as relative values, the endogenous activity of the cytosolic fraction being taken as 1.00.

Conditions	Fold
Cytosol	1.00
+ X	0.94
+ Hyd	1.10
+ s- b_5	22.8
+ Microsome	1.26
+ Microsome + Triton	22.1

Table 3-2. Effects of phospholipids on reconstitution of the CMP-NeuAc hydroxylation activity with the partially purified hydroxylase and the microsomal fraction. The hydroxylation activity was measured using the partially purified hydroxylase (14.5 μ units) under the various conditions listed. *s-b₅*, the soluble form of cytochrome *b₅* (40 pmol protein); X, a fraction containing *b₅* reducing factor(s) (5.5 μ g protein); Microsome, the microsomal fraction containing 40 pmol *b₅* protein; Triton, Triton X-100 (0.5%); PS, phosphatidylserine; PE, phosphatidylethanolamine; PI, phosphatidylinositol; PC, phosphatidylcholine. Activity is expressed as a percentage of that with the hydroxylase, *s-b₅* and X (100%).

Conditions	% of control
+ <i>s-b₅</i> + X	100
+ Microsome + Triton	139
+ Microsome	4.5
+ Microsome + PS	7.4
+ Microsome + PE	4.9
+ Microsome + PI	3.9
+ Microsome + PC	3.6

第4節 実験方法

実験材料

水酸化酵素反応に用いた試薬、因子類は第1章の通りである。また、遺伝子工学に使う酵素類は第2章の通りである。水酸化活性測定に用いたリン脂質ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジリンノシトール、ホスファチジルコリンはSigmaより購入した。その他の試薬は、和光純薬、ナカライテスクから購入した。遺伝子工学用の試薬は、タカラ、東洋紡、日本ジーンから購入した。

動物

マウスは Balb/cCrSlc マウス（清水実験材料）5 週令の雄を使用した。

PCR プライマー

マウスの cDNA をホモロジーを利用して PCR するには先の章にある RB5-1 及び RB5-2 を使用した。また、クローニングの結果得られた塩基配列をもとに作製したプライマーは以下の通りである。

MB5-1 5'-ACTCAGAATTCCGAGATGGCCGGGCAGT-3'

MB5-2 5'-CAGGAATTCCACCAACTGGAATTAGACTCC-3'

MB5-3 5'-CTGGACACCTTTAAGATTC-3'

これらのプライマーの作製には Applied Biosystem Inc. の DNA 合成機 391A を使用した。

PCR

第 2 章の方法に準じて行った。

サブクローニングとシーケンス

第 2 章の方法に準じて行った。

CMP-NeuAc 水酸化活性測定

第 1 章の方法に準じて行った。

マウス肝臓ミクロソーム画分の調製

マウスの肝臓を門脈から 0.25M ショ糖、1mM EDTA、2 μ g/ml ペプスタチン A、2 μ g/ml TLCK を含む Tris-HCl pH 7.5 の緩衝液で灌流した。その後、肝臓を単離し、同じ緩衝液中でホモジナイズした。このホモジネートを 10,000 \times g で 20 分間遠心した後、さらに 0.5M のショ糖に重層し 140,000 \times g で 3 時間超遠心してこの沈殿物を 0.15M NaCl、1mM EDTA 含む Tris-HCl pH 7.5 の緩衝液に対して透析した。この画分をミクロソーム画分と予備、ここには膜結合型の b_5 と膜結合型の b_5 還元因子が入っていると考えられる。また、CMP-NeuAc 水酸化活性測定に用いた b_5 は、可溶型もミクロソーム画分も吸光度により当量の b_5 が入っている。

タンパク定量

第 1 章に準じて行った。

第5節 考察と総括

この章ではマウス肝臓における b_5 の mRNA は膜結合型のみで、この膜結合型 b_5 が CMP-NeuAc 水酸化酵素反応に利用されることを明らかにした。しかし、mRNA レベルでは検出できなかったが、肝臓サイトゾール画分では少ないながらもタンパクレベルでの可溶性の活性が存在していた。このサイトゾールでの可溶性の b_5 活性の存在が第1章を始めとする CMP-NeuAc 水酸化酵素の初期の研究には非常に重要であったことが考えられる。つまり、この反応は多くのタンパク性の因子を必要とし、比較的複雑な経路を介して触媒を行っている。この反応の構成因子が全てサイトゾール画分に含まれていたことで、当初は明らかではなかったこれらの多くの構成因子が必要であるにも関わらず、この活性を比較的容易に追うことができたことが考えられる。また、第3章の結果、この反応が利用している b_5 が膜結合型であることが考えられ、第1章で明らかにした b_5 還元因子も、膜結合型の b_5 還元酵素を利用しているものと考えられる。

また、今回使用したマウス肝臓ミクロソーム画分は b_5 源としては界面活性剤の存在下でしか働けなかった。しかし、これまでに明らかとなっている同じくミクロソーム画分に存在する膜結合型の b_5 還元酵素が膜結合型の b_5 に電子を受け渡す活性を再構成系において追跡する際にも界面活性剤を必要としたという事実⁽⁵⁴⁾からも、このことは b_5 が可溶型である必要があるのではなく、膜結合型の b_5 の活性を再構成系において測定する際に界面活性剤が必要である事を示唆していると考えられる。

ところで、膜結合型 b_5 は両親媒性のタンパク質であり、遊離リボソームで合成され、カルボキシル末端に存在する ER 膜移行シグナルにより ER 膜に輸送されることが知られている。また、一時的に遺伝子導入により大量に動物細胞に発現されると膜結合型の b_5 が細胞分画、ごく少量ながらサイトゾール画分に存在することが示されている⁽⁵²⁾。したがってここでみられた可溶型の b_5 は ER 膜に輸送される途中の膜結合型 b_5 である可能性がある。また、ウシの赤血球で示されたのと同じように⁽⁴⁰⁾ 膜結合型 b_5 をプロテアーゼで切断し可溶型にする機構がマウスの肝臓においても少しはあるかもしれない。もしくは、単純に、ホモジナイズなどの実験上の操作により人工的に作られたものであることも否定できない。

マウスとウサギの b_5 のホモロジーは翻訳領域で非常に高いが、非翻訳領域ではほとんど見られないと言う事実は、この b_5 のとる高次構造と関係があるかもしれない、というのも、 b_5 は、非常に高温にも安定であることが知られており、しっかりとフォールディングしていることが予想される。このため、少しでも翻訳領域に変異が入ると、この高次構造に乱れが生じ、作用に支障を来すかもしれない、このため、各種の動物内で、進化の過程による多様性の形成をする猶予が与えられておらず、このように高いホモロジーを持っていることが考えられる。

最近、共同研究者の川野らがマウス肝臓から CMP-NeuAc 水酸化酵素を精製し⁽⁴²⁾、cDNA クローニングを行った⁽⁴³⁾。この mRNA は肝臓の他、胸腺やリンパ球といったこれまでに酵素活性があることが知られているところに分布しており、また、活性の見られない脳では全く見られないなど、この酵素が細胞内の NeuGc の発現に大きく関わっていることが改めて明らかとなった。

ここで得られたクローンのさらに詳しい解析により CMP-NeuAc 水酸化酵素の mRNA には二種類の分子種があることが明らかとなった。これらを、膜結合型 b_5 しか持たないことが知られている COS1 細胞にトランスフェクトしたところ、活性型のアイソフォームをトランスフェクトした COS1 細胞では全シアル酸分子中の NeuGc の割合が有意に上昇したことから、膜結合型 b_5 は可溶性の CMP-NeuAc 水酸化酵素に十分利用されることが明らかとなった⁽⁴⁵⁾。また、水酸化活性を持たない短いアイソフォームは 134 アミノ酸の欠落が認められるが、この部位が CMP-NeuAc との結合に関与していると考えられている⁽⁴⁴⁾。この短いアイソフォームは細胞内分布が膜結合型 b_5 と類似しており、これは、アミノ酸の欠落により何らかの高次構造に変化が生じ CMP-NeuAc と結合しなくても b_5 と結合できて、このために b_5 を介して ER 膜に結合している可能性もある⁽⁴⁵⁾。

このように、CMP-NeuAc 水酸化酵素の発現があるかないかで細胞内の NeuGc の発現量が決まると考えられてきた。また、一般に培養細胞では NeuGc の発現は比較的低いものが多い⁽⁴⁶⁾。最近、Muchmore らはゲノムにランダムに挿入して、挿入部位の遺伝子の機能を損なう変異株のレトロウイルスを使用してこれを CHO 細胞に使用した。この細胞を NeuAc に特異的に結合するレクチンである WGA により選択し、これに耐性を持ち、NeuGc を高発現している CHO 細胞株をいくつか単離することに成功した^(47,48)。この挿入部位をさらに解析することにより、これらの挿入部位はゲノムの一定の部位に挿入されていることが明らかとなり、この遺伝子は非常に短いペプチドをコードしており、このペプチドが CMP-NeuAc 水酸化酵素の作用を阻害する可能性を示した⁽⁴⁹⁾。このことは、CMP-NeuAc 水酸化酵素をさらに阻害することにより NeuGc の発現が調節される可能性を示しており、非常に興味深い。また、我々の反応系においては酵素源はあらかじめ透析したものを用いており、この操作により、ペプチド性の阻害剤はこれまで検出できなかったのかもしれない。

おわりに

分子生物学的手法を用いる糖鎖機能の解析はあまり進んでいない。これは糖鎖は多岐にわたる糖転移酵素群の遺伝子産物より作り出される二次産物であり分子生物学的アプローチが困難なためであることによる。著者らの系では、各種シアル酸転移酵素の供与体となる細胞質のCMP-シアル酸に強い親和性を持ち、これを変換するCMP-NeuAc水酸化酵素を用いているため、この酵素を細胞に導入すれば、細胞の複合糖質糖鎖中に存在するシアル酸のうちN-グリコシル体の比率がN-アセチル体に比べて圧倒的優勢となることが予想される。すなわち、この系はこれまで進んでいなかった分子生物学的アプローチにより直接的な糖鎖機能の解明の進展に寄与するものと期待されている。

また、近年、ヒト起源の生理活性物質が遺伝子工学的手法に基づき産生され医薬品として使用されてきている。これらのリコンビナント製品はチャイニーズハムスター由来のCHO細胞などの細胞で作られることが多く、このため、これらの製品には天然型以外の糖鎖が付加していると思われる⁽⁵³⁾。CHO細胞により作製された糖タンパク質の糖鎖には、NeuGcを含むものが存在する。NeuGcは、通常ヒトでは発現していないためヒト免疫系により非自己と認識され、繰り返し投与されることでショック症状が起こる可能性がある。したがってNeuGcの発現調節機構を明らかにすることはCHO細胞でNeuGcを含まない糖タンパク質製剤を作製する為の基礎研究としても非常に重要であると考えられる。

結論

シトクロム b_5 の役割を中心としたCMP-NeuAc水酸化反応機構に関する研究を行い、以下のような知見を得た。

1. マウス肝臓においてCMP-NeuAc水酸化反応に関与する因子を分画することに成功した。
2. このうち、シトクロム b_5 還元因子のCMP-NeuAc水酸化反応に対する影響及び性質を明らかにした。
3. シトクロム b_5 と CMP-NeuAc水酸化酵素の直接の相互作用機構を明らかにし、この反応機構に対する仮説を提唱した。
4. 可溶型シトクロム b_5 の cDNA を単離し、これが膜結合型の cDNA に 24 塩基の挿入を持つものであることを明らかにした。
5. シトクロム b_5 ゲノム遺伝子を単離し、可溶型と膜結合型の両者が選択的スプライシングにより生合成されていることを明らかにした。
6. マウス肝臓において発現しているシトクロム b_5 分子種は mRNA レベルでは膜結合型のみであることを明らかにした。
7. 肝臓の膜結合型シトクロム b_5 が CMP-NeuAc 水酸化反応に *in vitro* で関与できることを明らかにした。

謝辞

終わりに望み、本研究の機会を与えていただき、また、いろいろと御指導いただきました京都大学薬学部川寄敏祐教授に深く感謝の意を表します。また、直接熱心にご指導いただきました京都大学薬学部小堤保則助教授に謹んで感謝致します。さらに、本研究に際していろいろとご助言いただきました京都大学薬学部伊藤信行教授、岡昌吾博士、共同研究を通して貴重なご助言をいただきました東京都立臨床医学総合研究所鈴木明身部長、東京大学医科学研究所川野武弘博士に深く感謝の意を表します。

また、本研究に種々のご助力をいただいた京都大学薬学部生物化学教室の皆様から心から感謝いたします。

引用文献

1. Schauer R. (1982) *Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function* New York: Springer-Verlag.
2. Ashwell G. and Harford J. (1982) *Ann. Rev. Biochem.* **51**, 531-554
3. Landmesser L., Dahm L., Tang J.C. and Rutishauser U. (1990) *Neuron* **4**, 655-667
4. Larsenn G.R., Sako D., Ahern T. J., Shaffer M., Erban J., Sajer S. A., Gibson R. M., Wanger D. D, Furie B.C. and Furie B. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 11104-11110
5. Kawano T., Takasaki S., Tao T.W. and Kobata A. (1991) *Glycobiology* **1**, 375-385
6. Suzuki Y., Nagao Y., Kato H., Suzuki T., Matsumoto M and Murayama J. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **903**, 417-424
7. Varki A. (1992) *Glycobiology* **2**, 25-40
8. Muchmore E.A., Milewski M., Varki A. and Diaz S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 20216-20223
9. Shaw L. and Schauer R. (1988) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369**, 477-486
10. Shaw L. and Schauer R. (1989) *Biochem. J.* **263**, 355-363
11. Hirabayashi Y., Kasakura H., Matsumoto M., Higashi H., Kato S., Kasai, N. and Naiki M. (1987) *Jpn. J. Cancer Res.* **78**, 251-260
12. Devine P.L., Clark B.A., Birrell G.W., Layton G.T., Ward B.G., Alewood, P.F., and McKenzie F.C. (1991) *Cancer Res.* **51**, 5826-5836
13. Bouhours D. and Bouhours J-F. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 299-304
14. Bouhours D. and Bouhours J-F. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 15540-15545
15. Kelm S., Pelz A., Schauer R., Filbin M. T., Tang S., de-Bellard M. E., Schnarr R. L., Mohoney J. A., Hartnell A. and Bradfield P. (1994) *Curr. Biol.* **4**, 965-972
16. Kozutsumi Y., Kawano T., Yamakawa T., and Suzuki A. (1990) *J. Biochem.* **108**, 704-706
17. Kozutsumi Y., Kawano T., Kawasaki H., Suzuki K., Yamakawa T., and Suzuki A. (1991) *J. Biochem.* **110**, 429-435
18. Kawano T., Kozutsumi Y., Takematsu H., Kawasaki T. and Suzuki A. (1993) *Glycoconjugate J.* **10**, 109-115
19. Takematsu H., Kawano T., Koyama S., Kozutsumi Y., Suzuki A. and

- Kawasaki T. (1994) *J. Biochem.* **115**, 381-386
20. Takematsu H., Kawano T., Kozutsumi Y., Suzuki A. and Kawasaki T. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**, 845-851
 21. Takematsu H., Kozutsumi Y., Suzuki A. and Kawasaki T. (1995) *DNA Sequence-The Journal of Sequencing and Mapping* **5**, in press
 22. Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J. and Klenk D. C. (1985) *Anal. Biochem.* **150**, 76-85
 23. Passon P. G. and Hultquist D. E. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* **275**, 62-73
 24. Tamura M., Yubisui T. and Takeshita M. (1983) *J. Biochem.* **94**, 1547-1555
 25. Hultquist D. E. and Passon P. G. (1972) *Nature (New Biol.)* **229**, 252-254
 26. Oshino, N., Imai, Y., and Sato, R. (1971) *J. Biochem.* **69**, 155-167
 27. Paltauf, F., and Holasek, A. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 1609-1615
 28. White, R. E., and Coon, M. J. (1980) *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 315-356
 29. Abe K., Kimura S., Kizawa R., Anan F. K., and Sugita Y. (1985) *J. Biochem.* **97**, 1569-1668
 30. Ozols J. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **997**, 121-130
 31. Dariush N., Fisher C. W. and Steggles A.W. (1988) *Protein Seq. Data Anal.* **1**, 351-353
 32. Yoo M. and Steggles A. W. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**, 576-580
 33. Yoo M. and Steggles A. W. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**, 18-24
 34. Rich A. (1967) in *Methods Enzymol.* (Grossman, L., and Moldave, K., eds), **12A**, pp. 481-491, Academic Press, New York.
 35. MacDonald I. J., Swift G. H., Prtybyla A. E. and Chirgwin J. M. (1987) *Methods Enzymeol.* **152**, 219-227
 36. Frohman M. A. (1990) *PCR protocols*, pp. 28-38 Academic Press, New York.
 37. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, pp. 2.2.1-2.2.3, John Wiley & Sons, New York.
 38. Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning*,

2nd Ed., pp. 2.108-2.122

39. Giordano S.J. and Steggles A.W. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 38-44
40. Cristiano R.J., Giordano S.J. and Steggles A.W. (1993) *Genomics* **17**, 348-354
41. Giordano S.J. and Steggles A.W. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1172**, 95-100
42. Kawano T., Kozutsumi Y., Kawasaki T. and Suzuki A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 9024-9029
43. Kawano T., Koyama S., Takematsu H., Kozutsumi Y., Kawasaki H., Kawashima S., Kawasaki T. and A, Suzuki (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 16458-16463
44. Schlenzka W., Kelm S., Shaw L., Lottspich F. and Schauer R. (1995) *Glycoconjugate J.* **12**, 507
45. Koyama S., Yamaji T., Takematsu H., Kozutsumi Y., Suzuki A. and Kawasaki T. (1995) *Glycocojugate J. in press*
46. Stanley P. (1983) *Methods Enzymeol.* **96**, 157-184
47. Muchmore E. A. (1992) *Glycobiology* **2**, 337-343
48. Hubbard S. C., Walls L., Ruley H. R. and Muchmore E. A. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 3717-3724
49. Walls L., Dennis J. and Muchmore E. A. (1995) *Glycoconjugate J.* **12**, 565
50. Hegesh E., Hegesh J. and Kaftory A. (1986) *N. Eng. J. Med.* **314**, 757-761
51. Giordano S. J., Kaftory A. and Steggles A. W. (1994) *Hum. Genet.* **93**, 568-570
52. Mitoma J. and Ito A. (1992) *EMBO J.* **11**, 4197-4203
53. Hokke C. H., Bergwerff A. A., van Dedem G. W. K., van Oostrum D., Kamerling J. P. and Vliegthart F. G. (1990) *FEBS Lett.* **275**, 9-14
54. Mihara K. and Sato R. (1975) *J. Biochem.* **78**, 1057-1073
55. Mukuria C. J., Mwangi W. D., Noguchi A., Waiyaki G. P., Asano T. and Naiki M. (1995) *Biochem. J.* **305**, 456-464